

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Romana Petermannová

PRODUKCE AUXINOVÉHO TRANSPORTÉRU PIN1
V HEK293 BUNĚČNÉ LINII

Production of auxin transporter PIN1 in HEK293 cell line

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Vaněk, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 26. srpna 2013

Podpis:

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na přípravě mé bakalářské práce. Především svému školiteli RNDr. Ondřeji Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, trpělivost a předání mnohých vědomostí. Dále Mgr. Janu Bláhovi za jeho ochotu s čímkoliv pomoci a poradit a také všem ostatním členům laboratoře 204. Děkuji RNDr. Martině Laňkové, Ph.D. za možnost vypracování akumulace auxinu a imunofluorescence v Ústavu experimentální botaniky AV ČR. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě neustále podporovali v době mého studia.

OBSAH:

SEZNAM ZKRATEK	- 6 -
1 ÚVOD	- 8 -
2 TEORETICKÝ ÚVOD	- 9 -
2.1 Auxin	- 9 -
2.1.1 Metabolismus auxinu	- 9 -
2.1.2 Transport auxinu	- 11 -
2.2 Transportéry auxinu.....	- 11 -
2.2.1 Rodina transportérů AUX1/LAX.....	- 11 -
2.2.2 Rodina transportérů ABCB	- 12 -
2.2.3 Rodina transportérů PIN.....	- 13 -
3 CÍLE PRÁCE.....	- 17 -
4 MATERIÁL.....	- 18 -
4.1 Pomůcky a přístroje	- 18 -
4.2 Chemikálie.....	- 20 -
4.3 Enzymy.....	- 21 -
4.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie	- 21 -
4.5 Vektory	- 22 -
4.6 Oligonukleotidy pro PCR	- 22 -
4.7 Roztoky a média.....	- 22 -
5 METODY	- 24 -
5.1 Práce s DNA.....	- 24 -
5.1.1 PCR amplifikace	- 24 -
5.1.2 Agarosová elektroforéza.....	- 24 -
5.1.3 Preparativní agarosová elektroforéza	- 25 -
5.1.4 Extrakce DNA z agarosového gelu.....	- 25 -
5.1.5 Extrakce DNA srážením v ethanolu.....	- 25 -
5.1.6 Restrikční štěpení.....	- 25 -
5.1.7 Přečištění inzertů	- 26 -
5.1.8 Ligace inzertů do vektorů pTW5 a pTW5sec.....	- 26 -
5.1.9 Transformace kompetentních bakterií tepelným šokem	- 26 -
5.1.10 PCR z kolonií.....	- 26 -

5.1.11 Příprava plasmidové DNA	- 27 -
5.1.12 Sekvenování DNA	- 27 -
5.2 Příprava zásobního množství plasmidové DNA	- 28 -
5.2.1 Transformace a kultivace <i>E.coli</i>	- 28 -
5.2.2 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA	- 28 -
5.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA	- 29 -
5.3 Expresní test	- 29 -
5.3.1 Počítání buněčné hustoty HEK293 buněčné linie.....	- 29 -
5.3.2 Transfekce HEK293 buněčné linie	- 29 -
5.3.3 SDS elektroforéza	- 30 -
5.3.4 Elektropřenos	- 31 -
5.3.5 Imunodetekce	- 31 -
5.4 Purifikace proteinů.....	- 32 -
5.4.1 Izolace proteinu z membrány	- 32 -
5.4.2 Chelatační chromatografie	- 33 -
5.4.3 SDS elektroforéza pro hmotnostní spektrometrii	- 33 -
5.4.4 Vsádková chelatační chromatografie.....	- 33 -
5.4.5 Gelová permeační chromatografie	- 34 -
5.5 Akumulace auxinu	- 34 -
5.6 Imunofluorescence	- 35 -
5.6.1 Permeabilizované buňky	- 35 -
5.6.2 Nepermeabilizované buňky	- 36 -
6 VÝSLEDKY	- 37 -
6.1 Příprava plasmidové DNA	- 37 -
6.2 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA	- 41 -
6.3 Expresní test	- 41 -
6.4 Purifikace proteinu.....	- 43 -
6.5 Akumulace auxinu	- 45 -
6.6 Imunofluorescence	- 47 -
7 DISKUZE.....	- 50 -
8 ZÁVĚR	- 53 -
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 54 -

SEZNAM ZKRATEK

³ H-IAA	tritíem značená kyselina indolyl-3-octová („indolyl-3-acetic acid“)
³ H-NAA	tritíem značená kyselina naftalen-1-octová („naphthalene-1-acetic acid“)
AA	akrylamid
ABCB	rodina přenašečů auxinu („ATP binding cassette subfamily B“)
AP	alkalická fosfatasa („alkaline phosphatase“)
APS	peroxosíran amonný („ammonium persulfate“)
ATP	adenosintrifosfát („adenosin triphosphate“)
AUX1/LAX	rodina přenašečů auxinu („auxin-resistant1/like AUX1“)
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolyl fosfát („5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate“)
bp	pár bazí („base pair“)
BSA	hovězí sérový albumin („bovine serum albumin“)
BY-2	linie buněk <i>Nicotiana tabacum</i> („bright yellow-2“)
dH ₂ O	deionizovaná voda
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina („deoxyribonucleic acid“)
dNTPs	směs deoxynukleotidtrifosfátů
DTT	1,4-dithiothreitol
ECL	zesílená chemiluminiscence („enhanced chemiluminiscence“)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GFP	zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“)
HEK293	buněčná linie lidských embryonálních ledviných buněk 293 („human embryonic kidney 293“)
HeLa	buněčná linie lidských epitelových buněk („Henrietta Lacks“)
HRP	křenová peroxidasa („horseradish peroxidase“)
HSA	lidský sérový albumin („human serum albumin“)
IAA	indolyl-3-octová kyselina („indolyl-3-acetic acid“)
LB	Luria Bertani medium
LLT1	receptor NK buněk („lectin like transcript 1“)

IPEI	lineární polyethylenimin
mAb	monoklonální protilátka („monoclonal antibody“)
NBT	nitrotetrazoliová modř („nitroblue tetrazolium“)
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok („phosphate buffered saline“)
PCR	polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)
PGP	fosfoglykoprotein („phosphoglycoprotein“)
PIN	rodina přenašečů auxinu („pin-formed“)
PM	plasmatická membrána
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce se zpětným přepisem („reverse transcription polymerase chain reaction“)
SEAP	sekretovaná alkalická fosfatasa („secreted alkaline phosphatase“)
SDS	dodecylsulfát sodný („sodium dodecyl sulfate“)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza („polyacrylamide gel electrophoresis“)
TAE	Tris-acetátový pufr s EDTA
TBS	Tris-pufovaný fyziologický roztok („Tris buffered saline“)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TES	pufr obsahující Tris, EDTA a chlorid sodný
TK	tkáňové kultury
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1 ÚVOD

Protein PIN1 patří do rodiny transportérů PIN. Tato skupina transportérů se významně podílí na přenosu auxinu vně z buňky. Přenos auxinu mezi rostlinnými buňkami hraje důležitou roli v růstu rostliny, gravitropismu, apod. Princip transportu auxinu tímto přenašečem není dosud příliš prozkoumaný.

Tato práce se zabývá produkcí transportéru PIN1 pomocí rekombinantní exprese proteinů v lidských embryonálních ledvinných buňkách 293. Produkce v těchto buňkách byla ověřena pomocí akumulace radioaktivního auxinu a imunofluorescence.

Klíčová slova:

PIN1, auxin, transport, HEK293 buněčná linie, rekombinantní exprese

Keywords:

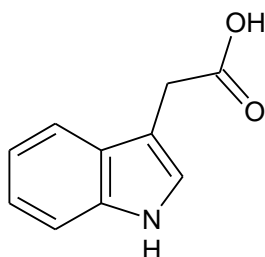
PIN1, auxin, transport, HEK293 cell line, recombinant expression

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Auxin

Kyselina indolyl-3-octová (IAA) neboli auxin je fytohormon řadící se mezi indolové deriváty (obr. 1). IAA byla poprvé objevena v roce 1934 v lidské moči, později v mikroorganismech a ve vyšších rostlinách. Syntéza IAA je lokalizována v meristémech a mladých částech rostlin. Nejdůležitějším zdrojem IAA u dvouděložných rostlin je vzrostný vrchol, embrya a také rostoucí listy [1].

Auxin ovlivňuje procesy jako je gravitropismus, fototropismus a hydrotropismus (pohyb rostlin vzhledem ke gravitaci, světlu či vodě). Dále je zodpovědný za prodlužování rostlinných buněk čili růst rostliny. Spolu s jinými fytohormony může ovlivnit spoustu dalších procesů. Například spolu s cytokininy určuje, zda bude rostlina tvořit převážně nadzemní či podzemní část nebo se spolu s cytokininy, ethylenem a strigolaktony podílí na kontrole apikální dominance [2].

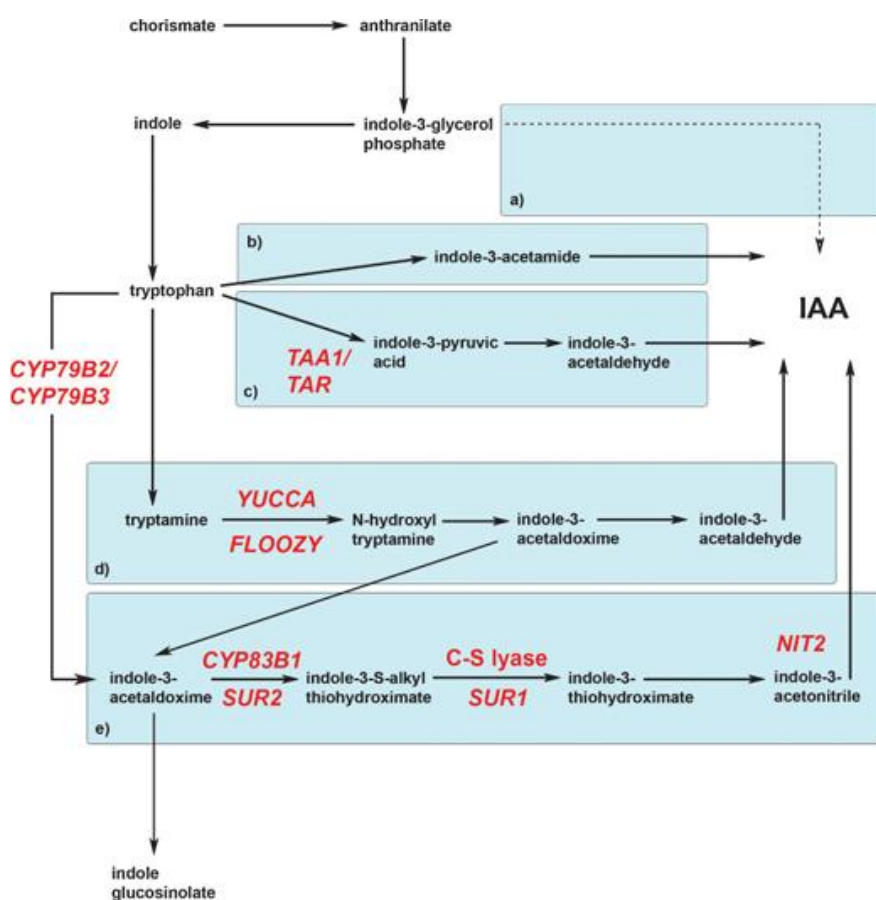


Obr. 1: Kyselina indolyl-3-octová (auxin)

2.1.1 Metabolismus auxinu

Rostliny používají pro biosyntézu IAA dvě trasy - tryptofan dependentní a tryptofan independentní. Tryptofan dependentní dráha je pro biosyntézu auxinu nejčastější. Prekurzorem syntézy auxinu tryptofan dependentní dráhou je tryptofan. Tato dráha se vyznačuje čtyřmi možnými cestami, které nejsou vždy od sebe plně odděleny a mohou se prolínat. Důležitými meziprodukty těchto cest jsou indolyl-3-acetamid, kyselina indolyl-3-pyrohroznová, tryptamin a indolyl-3-acetaldoxim (obr. 2, str. 10). Prekurzorem pro tryptofan independentní dráhu je indol nebo indolyl-3-glycerol fosfát. K regulaci hladiny auxinu v organismu přispívá jeho konjugace a dekonjugace. IAA může být konjugována se sacharidy, peptidy, aminokyselinami a proteiny, a tím může být auxin inaktivován. Některé konjugáty IAA s aminokyselinami slouží jako zásoba

auxinu (IAA-Ala, IAA-Leu), jiné předurčují auxin k degradaci (IAA-Asp, IAA-Glu). Ke konjugaci se sacharidem dochází díky modifikaci na indolovém kruhu IAA pomocí IAA-oxidas za vzniku oxidované formy IAA, která může interagovat s hexosami. Konjugáty IAA se sacharidy mohou sloužit jako zásoba auxinu nebo k jeho inaktivaci. Konjugáty IAA s proteiny mohou sloužit jako zásoba auxinu nebo k ovlivnění funkce a stability proteinu. Degradace auxinu je regulována množstvím auxinu v organismu a je zajišťována dvěma hlavními dráhami - dekarboxylativní a nedekarboxylativní oxidací. Tyto procesy jsou ireverzibilní [3, 4, 5].



Obr. 2: Biosyntéza auxinu

(a) Tryptofan independentní dráha, (b, c, d, e) tryptofan dependentní dráha s meziprodukty
 (b) indol-3-acetamidem, (c) kyselinou indol-3-pyrohroznovou, (d) tryptaminem a (e) indol-3-acetaldoximem; převzato z [3]

2.1.2 Transport auxinu

Transport auxinu z jedné buňky do druhé má zásadní význam pro vytvoření auxinového gradientu, který je nezbytný pro rozvoj a přizpůsobení rostlin určitým podmínkám [6].

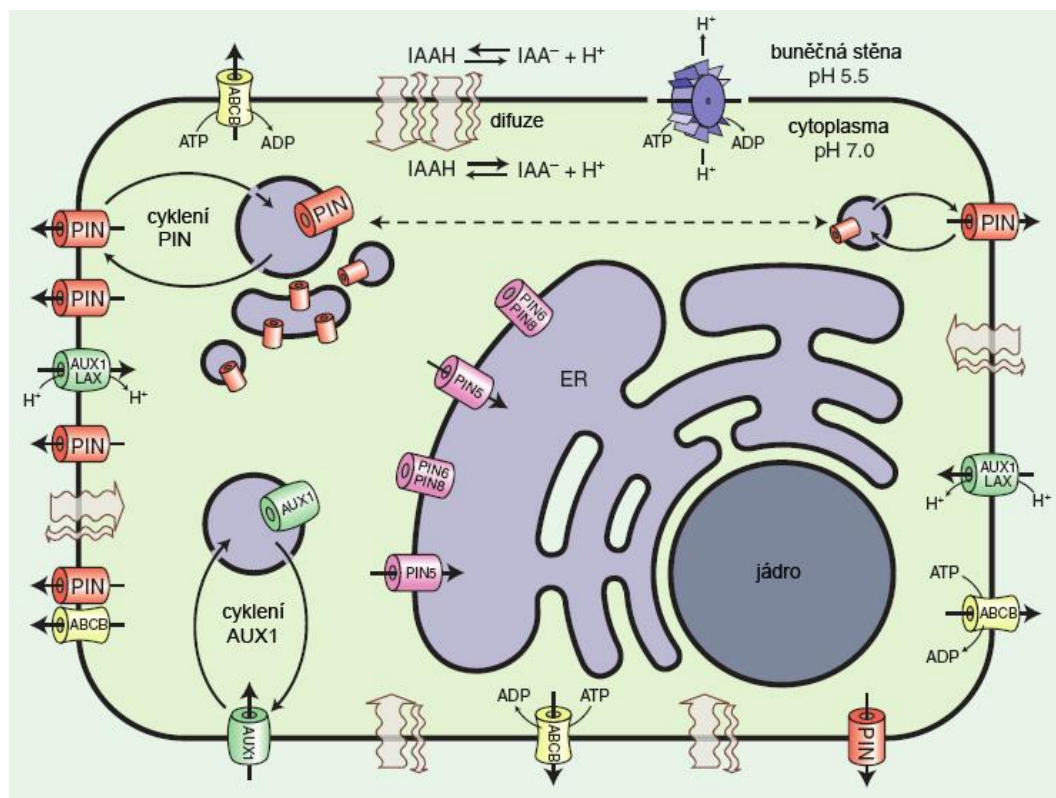
Auxin je polárně (jedním směrem - od vrcholu stonku ke kořenu) transportován difuzí a pomocí auxinových transportérů z rodin „auxin resistant1/like AUX1“ (AUX1/LAX), „ATP binding cassette subfamily B“ (ABCB) a „pin-formed“ (PIN). Tento přenos je určen chemiosmotickým gradientem [7, 8].

Při pH 5,5 v apoplastu (systém mezibuněčných prostor a buněčných stěn) se IAA vyskytuje z 83 % v disociované formě (IAA^-), která je přenášena pomocí přenašečů do buňky (např. AUX1) a ze 17 % v nedisociované formě, která je schopna přecházet skrze plasmatickou membránu difuzí. Vyšší pH (7,0) uvnitř buňky způsobí téměř úplnou disociaci IAA a tudíž nemůže být pasivně vyloučena ven z buňky. Hodnota pH v apoplastu a uvnitř buňky se liší díky ATPase umístěné v plasmatické membráně, která vylučuje H^+ ven z buňky. Pro transport IAA^- z buňky je potřeba proteinového přenašeče (např. PIN). Polární subcelulární lokalizace proteinů PIN je důležitá pro směr transportu auxinu. Pro změnu směru transportu auxinu je důležité cyklení proteinu PIN mezi plasmatickou membránou a endosomálními kompartmenty (viz. Obr. 3, str. 12) [7, 8].

2.2 Transportéry auxinu

2.2.1 Rodina transportérů AUX1/LAX

Při pH~5,5 je IAA transportována do buňky pomocí transportérů rodiny AUX1/LAX [9]. IAA je slabá kyselina, která při nízkém pH částečně disociuje, a proto nemohou být její polární molekuly transportovány do buňky prostou difuzí. Specifickým přenašečem, kterým jsou transportovány polární molekuly IAA je AUX1 a jeho homology z rodiny AUX1/LAX. Jako první přenašeč byl na molekulární úrovni charakterizován protein AUX1 u *Arabidopsis thaliana*. Později byla prokázána i jeho transportní funkce. AUX1 je strukturně podobný aminokyselinovým permeasám. IAA, která je strukturně podobná tryptofanu, je vhodným substrátem pro tyto přenašeče. IAA je tedy do buněk přenášena pomocí AUX1 aktivně symportem s protony [10 - 12].



Obr. 3: Model polárního transportu auxinu

Červené značky - dlouhé PIN přenašeče, růžové značky - krátké PIN přenašeče; fialové útvary - endosomy, ER - endoplasmatické retikulum; přerušovaná šipka - transcytosa; spolupráce PIN s ABCB je naznačena umístěním symbolů blízko sebe; převzato a upraveno z [8]

2.2.2 Rodina transportérů ABCB

ABCB transportéry patří mezi fosfoglykoproteiny a jsou přenašeče auxinu z buňky [13]. Z mnoha členů rodiny ABCB patří mezi transportéry auxinu pouze ABCB1, ABCB4 a ABCB19, které jsou v plasmatické membráně umístěny buď polárně nebo nepolárně [14]. Transportéry ABCB1/PGP1, ABCB4/PGP4 a ABCB19/PGP19 patří mezi nejprostudovanější členy rodiny ABCB a jsou schopné exportovat auxin jak v rostlinných, tak i v savčích buňkách [15]. Bylo prokázáno, že protein ABCB4/PGP4 je schopen přenášet auxin nejen z buněk, ale také do buněk. Tato skutečnost byla prokázána v HeLa buňkách pomocí ^3H -IAA [16]. ABCB transportéry se mohou shlukovat s transportéry PIN v mikrodoménách na plasmatické membráně a interagovat spolu, což pravděpodobně zvyšuje jejich substrátovou specifitu k auxinu [15].

2.2.3 Rodina transportérů PIN

Název PIN je odvozen od „pin-formed“ fenotypu květenství v mutantu *Arabidopsis thaliana*, který postrádá transportér PIN1 (obr. 4). PIN1 je hlavním zprostředkovatelem polárního toku auxinu ve vývoji krytosemenných rostlin.

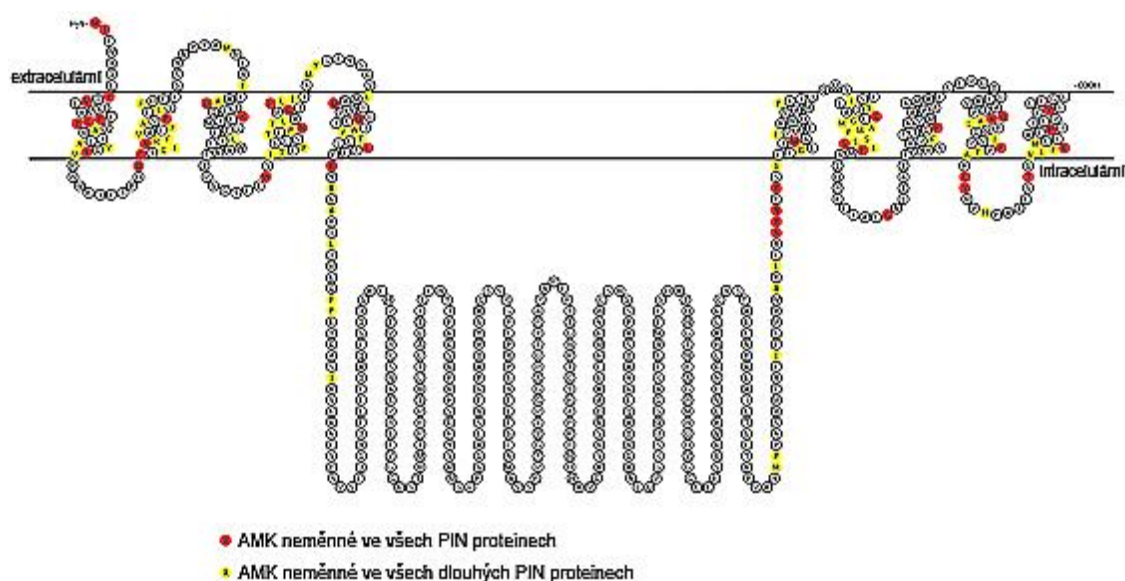


Obr. 4: Exprese přenašeče PIN1 ovlivňuje fenotyp květenství *Arabidopsis thaliana*

Vlevo - přirozený fenotyp; vpravo - „pin formed“ mutant postrádající přenašeč PIN1; převzato a upraveno z [17]

Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje osm genů PIN1-8. Pět z nich kóduje tzv. dlouhé PIN přenašeče (PIN1, 2, 3, 4 a 7) a tři z nich kódují tzv. krátké PIN přenašeče (PIN5, 6 a 8). Krátké PIN proteiny postrádají dlouhou hydrofilní smyčku, která byla nalezena u dlouhých PIN proteinů. Nacházejí se tedy pouze v membráně endoplasmatického retikula a pravděpodobně rozdělují auxin v intracelulárním prostředí. Dlouhé PIN proteiny (PIN1, 2, 4, 5 a 7) jsou lokalizovány na plasmatické membráně a zprostředkovávají transport auxinu z buňky, což bylo prokázáno ve více heterologních systémech. Všechny proteiny rodiny PIN jsou si velmi podobné. Mají dlouhou či krátkou hydrofilní smyčku v intracelulárním prostředí oddělující dvě transmembránové domény obsahující dohromady pět oblastí. Hydrofilní smyčka je nejvíce odlišnou částí. Hydrofobní domény mají vysoce specifickou sekvenci (především transmembránové helixy) a nejsou zde přípustné jakékoliv inserce či delece. Oproti tomu hydrofilní smyčka je velice variabilní, a to jak ve své sekvenci, tak i v délce. Předpokládaná struktura (Obr. 5, str. 14) dlouhých PIN přenašečů je velmi podobná struktuře sekundárních transportérů, tedy transportérům využívajících

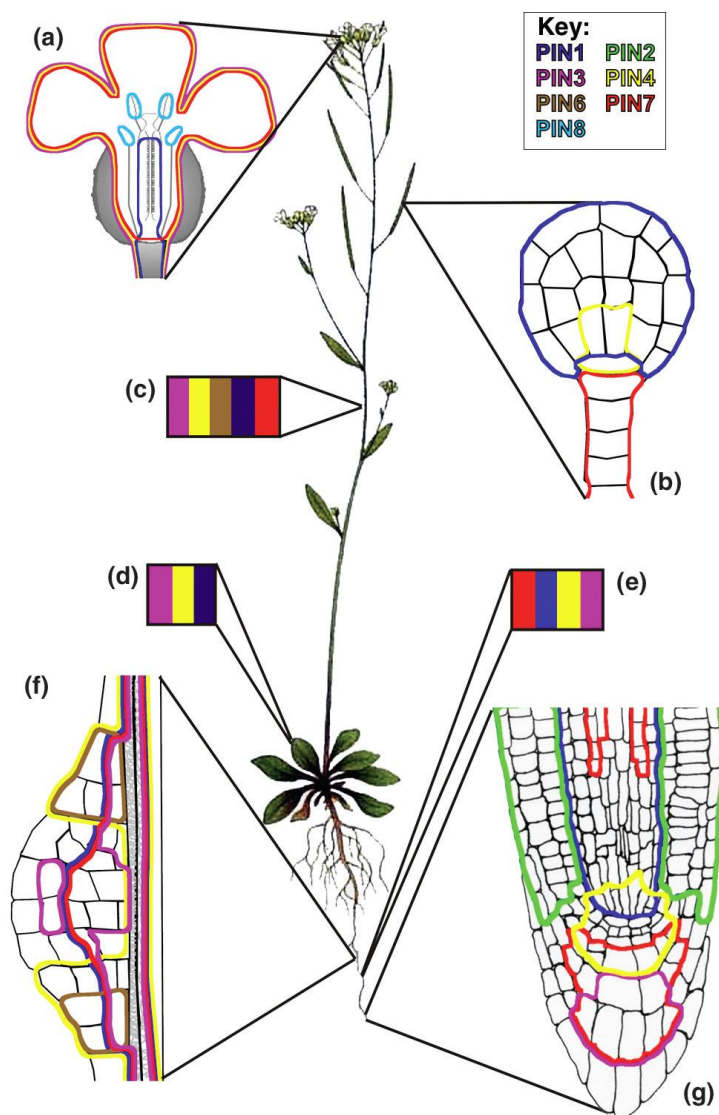
k přenosu spíše elektrochemického gradientu než hydrolýzy ATP [18]. Jejich pozice v plasmatické membráně (PM) není stálá a nejen, že neustále cyklují mezi PM a endosomálními kompartmenty, ale mohou také být přesouvány do různých částí buňky mechanismem podobným transcytose [8]. Tato recyklace je důležitá pro ustavení polární lokalizace přenašečů PIN v buňce a pro regulaci množství PIN přenašečů na plasmatické membráně. Nově syntetizované PIN proteiny jsou v buňce pravděpodobně orientovány nepolárně a k polární orientaci se přesouvají až řízenou recyklací [19]. Laterální mobilita PIN proteinů v membráně je značně omezena. Bylo prokázáno, že PIN1 a PIN2 není v membráně rovnoměrně rozptýlen, ale je soustředěn do shluků [20].



Obr. 5: Předpokládaná struktura PIN proteinů. Zobrazená sekvence odpovídá transportéru PIN7; červeně jsou znázorněny aminokyseliny v rámci PIN rodiny zcela neproměnné; žlutě pak aminokyseliny zcela konzervované; převzato a upraveno z [18]

Proteiny PIN mohou být lokalizovány na apikální (směrem k vzrostnému vrcholu), bazální (směrem ke kořenové špičce), nebo laterální (boční) plasmatické membráně v závislosti na typu proteinu, buňky a vývojové souvislosti (obr. 6, str. 15) [6]. Proteiny PIN1 a PIN2 jsou v membráně lokalizovány především polárně. PIN3, PIN4 a PIN7 vykazují polární i nepolární lokalizaci v plasmatické membráně, která závisí na typu buňky a vnějších podnětech [9]. PIN1 je bazálně lokalizován ve vodivých pletivech embrya, v listech a kořenech a apikálně lokalizován v epidermu vrcholu

stonku, embrya a gynecea (soubor plodolistů). PIN2 je apikálně lokalizován v kořenové čepičce postranních kořenů a rhizodermu a bazálně lokalizován v dřeni kořene. PIN3 je umístěn především laterálně a to na vnitřní straně endodermu stonku. Další PIN proteiny lokalizované v plasmatické membráně vykazují polární lokalizace v různých rostlinných pletivech, některé mohou být umístěny na membráně endoplasmatického retikula a umožňovat tak intracelulární transport auxinu (krátké PIN přenašeče) [6].



Obr. 6: Mapa lokalizace proteinů PIN v rostlinných orgánech

(a) květ, (b) embryo, (c) stonek, (d) list, (e) střední část hlavního kořene, (f) zárodek postranního kořene, (g) kořenová špička; legenda vpravo nahoře zobrazuje barevné kódování exprese jednotlivých PIN přenašečů; převzato z [18]

Gen PIN1 byl klonován značeným transpozonem a bylo zjištěno, že se skládá z 622 aminokyselin a pravděpodobně z dvanácti transmembránových segmentů, které jsou podobné jako u prokaryotických a eukaryotických transportérů [21].

Bylo experimentálně prokázáno, že pět proteinů z rodiny PIN funguje jako exportér auxinu z buňky také v HeLa buňkách, kvasinkách a tabákových buňkách BY-2 [13]. Pro expresi PIN1 byla použita buněčná suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana* linie XVE-PIN1, do které byla umístěna sekvence PIN1 pod kontrolou estradiolem indukovaného promotoru. Použití estradiolu vedlo k aktivaci exprese PIN1, což bylo prokázáno expresí PIN1 s GFP, RT-PCR PIN1 ve výhoncích a kultivovaných buňkách a akumulací ^3H -NAA (syntetický auxin), který je dobrým substrátem pro přenašeč auxinu z buňky. Dále byla použita buněčná kultura *Nicotiana tabacum* linie BY-2, do kterých byl umístěn PIN7 pod kontrolou dexamethasonem indukovaného systému a na plasmatické membráně byla prokázána zvýšená exprese PIN7. Exprese proteinů PIN byla prokázána také v heterologním systému, konkrétně v lidské buněčné kultuře HeLa. Buňky byly transfekovány PIN7 a PIN2 a vykazovaly silnou expresi těchto proteinů. Tato exprese byla dokázána zvýšeným exportem ^3H -IAA z buněk, oproti kontrolním buňkám transfekovaným prázdným vektorem. Transportní funkce PIN proteinů byla také ukázána v buňkách kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. V tomto systému byla prokázána exprese proteinů PIN2 a PIN7. Proteiny se nacházely v PM buněk a testy akumulace ^3H -IAA také prokázaly zvýšený export auxinu z buněk [22].

3 CÍLE PRÁCE

- Příprava expresního vektoru pro konstrukt PIN1 (PIN1a) a konstrukt PIN1b náležející hydrofilní smyčce tohoto proteinu
- Příprava PIN1 v HEK293 buněčné linii

4 MATERIÁL

4.1 Pomůcky a přístroje

Adhezivní podložka na třepačku Sticky Stuff	<i>Infors HT</i> , Švýcarsko
Analytické váhy	<i>AND</i> , USA
Automatické pipety Discovery	<i>HTL</i> , Polsko
Automatické pipety Pipetman	<i>Gilson</i> , USA
Blokový termostat LS1	<i>VLM</i> , Německo
Centrifuga 5415 R	<i>Eppendorf</i> , Německo
Centrifuga Allegra X-22R	<i>Beckman Coulter</i> , USA
Centrifuga EBA 12R	<i>Hettich</i> , Německo
Centrifugační zkumavky Oak Ridge	<i>Sigma-Aldrich</i> , USA
Filtry pro sterilizaci 0,22 µm	<i>TPP</i> , Švýcarsko
Filtry Millipore Express 0,22 µm	<i>Millipore</i> , USA
Fotoaparát Cyber-shot DSC-W570	<i>SONY</i> , Japonsko
Fotografický film MEDIX XBU	<i>Foma Bohemia</i> , ČR
Hemocytometr	<i>Sigma-Aldrich</i> , USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	<i>Geneaid</i> , USA
HPLC systém ÄKTAbasic	<i>GE Healthcare</i> , USA
Inkubátor CO ₂ pro tkáňové kultury, 18AIC	<i>Sanyo</i> , Japonsko
Inkubátor IR 1500	<i>LABsystem Praha</i> , ČR
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	<i>Genomed</i> , Německo
Kahan Fuego SCS	<i>VERKON</i> , ČR
Kolona s fritou Econo-column	<i>Bio-Rad</i> , Německo
Kolona Superdex 200 300/10 GL	<i>GE Healthcare</i> , USA
Konfokální mikroskop LSM 5 DUO	<i>Zeiss</i> , Německo
Koncentrátory Amicon Ultra	<i>Millipore</i> , USA
Láhve čtverhranné s prodyšnými víčky	<i>P-LAB</i> , ČR
Laminární box BIO 126	<i>LABOX</i> , ČR
Laminární box Clean Air Techniek B.V.	<i>PMV</i> , Nizozemsko
Lednice 225 R (4 °C)	<i>CALEX</i> , ČR
Membrána pro elektropřenos BioTrace	<i>Pall Corporation</i> , USA
Magnetická míchačka MM 2A	<i>Labor. přístroje Praha</i> , ČR

Mikrocentrifuga MiniStar Silverline	VWR, USA
Mikroskop inverzní AE31	Motic, Německo
Mrazicí box (-20 °C)	Zanussi, Itálie
Mrazicí box Ultra-low UDF-U53V (-80 °C)	Sanyo, Japonsko
Nosič pro IMAC chromatografii Talon	Clontech, USA
pH metr 3310	Jenway, UK
Pipetovací nástavec Midi plus	Biohit, USA
Plastik pro tkáňové kultury	TPP, Švýcarsko
Předvážky KB1200-2	Kern, Německo
PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit	Invitrogen, USA
Rotační vakuová odparka SpeedVac DNA 110	Savan, USA
Scaner LiDE 210	Canon, Japonsko
Scintilační detektor Packard Tri-Carb 2900TR	Canberra Packard, USA
Sonikační lázeň	Bandelin, Německo
Souprava pro agarosovou elektroforézu	Biokeystone Co, USA
Souprava pro elektropřenos	Biometra, Německo
Souprava pro filtraci za sníženého tlaku	Sigma-Aldrich, USA
Souprava pro SDS-PAGE	Bio-Rad, Německo
Spektrofotometr NanoVue Plus	GE Healthcare, USA
Spektrofotometr UV/VIS UNICAM	Beckman, USA
Termocykler, 0,5 ml × 20	Techne, UK
Třepačka Celltron	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Multitron Cell	Infors HT, Švýcarsko
Třepačka Orbi-Safe TS NetWise	Schöeller, Německo
Ultrazvukový sonikátor	Bandelin, Německo
UV prosvěcovací lampa (300 nm)	Ultra-Lum, USA
UV prosvěcovací lampa (312 nm)	UVitec, UK
Vaříč	ETA, ČR
Vodní lázeň WNE14	Memmert, Německo
Vodní lázeň TW2	Julabo, Německo
Vortexový mixer	VELP Scientifica, Itálie
Zdroj deionizované vody Milli Q	Millipore, USA

4.2 Chemikálie

³ HIAA	<i>American Radiolabeled Chemicals, USA</i>
Agar	<i>Oxoid, UK</i>
Agarosa	<i>Sigma, USA</i>
Akrylamid	<i>Sigma, USA</i>
Ampicilin 100 mg/ml	<i>Biotika, SR</i>
APS	<i>Serva, USA</i>
Azid sodný	<i>Serva, USA</i>
Bromfenolová modř	<i>Lachema, ČR</i>
BSA	<i>New England Biolabs, USA</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
Činidlo dle Bradfordové	<i>Bio-Rad, Německo</i>
DMSO	<i>Sigma, USA</i>
DNA standard 1kb	<i>New England Biolabs, USA</i>
DNA standard 100bp	<i>New England Biolabs, USA</i>
dNTPs, 10mM	<i>Top Bio, ČR</i>
DTT	<i>Serva, USA</i>
EDTA	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
ExCELL293 médium	<i>Sigma, USA</i>
Freestyle F17 médium	<i>Gibco Invitrogen, USA</i>
Glycerol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Glycin	<i>Fluka, Švýcarsko</i>
GoodView	<i>Ecoli, Slovensko</i>
Isopropanol	<i>Lach-Ner, ČR</i>
Kvasničný extrakt	<i>Imuna Pharm, ČR</i>
L-glutamin	<i>Sigma, USA</i>
IPEI 25 kDa	<i>Polysciences, USA</i>
MgSO ₄ , 100mM	<i>New England Biolabs, USA</i>
Paraformaldehyd	<i>Serva, USA</i>
Penicilin	<i>Sigma, USA</i>
PentaHis mAb	<i>Qiagen, Německo</i>

Pink Protein Ladder	<i>Central European Biosystems, ČR</i>
Pluronic F68	<i>Sigma, USA</i>
PPP PCR master mix	<i>Top-Bio, ČR</i>
Protilátka „Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG“	<i>Molecular Probes, USA</i>
Protilátka „Goat anti-mouse IgG - AP“	<i>Merck, ČR</i>
Protilátka „Goat polyclonal IgG anti-PIN1“	<i>Santa Cruz Biotechnol, USA</i>
Protilátka „Rabbit anti-mouse IgG-HRP“	<i>Sigma, USA</i>
Pufr NEB1	<i>New England Biolabs, USA</i>
Pufr pro T4 DNA ligasu	<i>New England Biolabs, USA</i>
Scintilační roztok EcoLite Liquid Scintillation Fluid	<i>MP Biomedicals, USA</i>
SDS	<i>Jersey Lab Supply, USA</i>
Streptomycin	<i>Serva, USA</i>
TEMED	<i>Serva, USA</i>
Tris	<i>Roth, Německo</i>
Triton X-100	<i>Serva, USA</i>
Trypanová modř	<i>Sigma, USA</i>
Trypton	<i>Oxoid, UK</i>
Tween 20	<i>Serva, USA</i>
Ustalovač	<i>Foma Bohemia, ČR</i>
Vývojka	<i>Foma Bohemia, ČR</i>
Ostatní běžné chemikálie	<i>Lach-Ner, ČR</i>

4.3 Enzymy

AgeI	<i>New England Biolabs, USA</i>
DeepVent DNA polymerasa	<i>New England Biolabs, USA</i>
KpnI	<i>New England Biolabs, USA</i>
RNAsa A	<i>Serva, USA</i>
T4 DNA ligasa	<i>New England Biolabs, USA</i>

4.4 Bakteriální kmeny a buněčné linie

<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>Marek Ingr, PřF UK, Praha</i>
------------------------------	----------------------------------

HEK293T
HEK293-6E

A. Radu Arisescu, Oxford
Y. Durocher, Montreal

4.5 Vektory

pJET
pTW5
pTW5sec

Fermentas, Kanada
Edita Poláchová, PřF UK
Lukáš Slavata, PřF UK

4.6 Oligonukleotidy pro PCR

PIN1a_FW: 5' AAAAACCGGTATTACGGCGGGCGGACTTCTA 3'
PIN1a_REV: 5' TTTTGGTACCTAGACCCAAGAGAATGTAGTAGAG 3'
PIN1b_FW: 5' AAAAACCGGTGAGTACCGTGGAGCTAAGCTTTT 3'
PIN1b_REV: 5' TTTTGGTACCACTGGAGTAAGAGTTGGGATTACG 3'
pTW5_REV: 5' AAGCAGCGTATCCACATAGCG 3'
pTT_FW: 5' TGATATTCACCTGGCCCGATCTG 3'

4.7 Roztoky a média

AA: 29% akrylamid, 1% N,N'-methylen-bis-akrylamid
Barvicí roztok pro SDS-PAGE: 45% methanol, 10% kyselina octová; 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250
Blokovací pufr pro imunodetekci: 3% BSA, 10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5
ECL1: 2,5mM luminol, 0,1mM Tris, pH 8,8
ECL2: 5,4mM H₂O₂, 0,1mM Tris, pH 8,8
Elektrodový pufr pro SDS-PAGE (10× koncentrovaný): 3% Tris; 14,4% glycin, 1% SDS, pH 8,3
ExCELL293 médium: před použitím doplněno o 4mM L-glutamin
F17 médium: před použitím doplněno o 4mM L-glutamin a 0,1% Pluronic F-68
LB agar: 1,5% agar v LB médiu
LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, pH 7,4; ampicilin 100 µg/ml
Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE: 35% ethanol, 10% kyselina octová
PBS pufr: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 7,0

PBS pufr s imidazolem: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM NaN₃, 250mM imidazol, pH 7,0

PBS-TK pufr: 10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, 2mM KCl, 2mM KH₂PO₄, pH 7,0

PBS(5,5) pufr: 50mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, pH 5,5

Přenosový pufr: 25mM Tris, 150mM glycín, 10% (v/v) methanol, pH 8,3

PureLink™ HiPure Plasmid DNA Maxiprep Kit

Ekvilibrační pufr EQ1: 0,1M octan sodný, 0,6M NaCl, 0,15% Triton X-100, pH 5,0

Eluční pufr E4: 100mM Tris-HCl; 0,1mM EDTA; 1,25M NaCl, pH 8,5

Lyzační pufr L7: 0,2M NaOH, 1% SDS

Promývací pufr W8: 0,1M octan sodný, 825mM NaCl, pH 5,0

Resuspendační pufr R3: 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100 µg/ml RNAsa A, pH 8,0

Srážecí pufr N3: 3,1M octan draselný, pH 5,5

Roztok IPEI: 1 mg/ml IPEI, pH 7,0

STOP pufr: 30% glycerol, 1% bromfenolová modř, 70% TE pufr

TAE pufr (1× koncentrovaný): 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA, pH 8,3

TBS pufr: 10mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5

TBSTT pufr: 20mM Tris, 500mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, 0,2% (v/v) Triton X-100, pH 7,5

TE pufr: 10mM Tris, 0,5mM EDTA, pH 8,0

TES pufr: 10mM Tris, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM NaN₃, pH 8,0

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (2× koncentrovaný): 100mM Tris, 20% glycerol, 4% SDS, 0,2% bromfenolová modř, 100mM DTT, pH 6,8

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující (5× koncentrovaný): 250mM Tris, 50% glycerol, 10% SDS, 0,5% bromfenolová modř, 100mM DTT, pH 6,8

5 METODY

5.1 Práce s DNA

5.1.1 PCR amplifikace

V 0,5ml mikrozkušavce pro PCR bylo smícháno 28 μ l dH₂O, 5 μ l pufru pro polymerasu; 1,5 μ l 100mM MgSO₄; 1,5 μ l 10mM dNTPs, 5 μ l 5 μ M přímého primeru PIN1a_FW, 5 μ l 5 μ M reverzního primeru PIN1a_REV, 1 μ l templátu (c = 25 ng/ μ l); 0,5 μ l DeepVent DNA polymerasy a 2,5 μ l DMSO.

Další dvě reakce byly provedeny bez použití DMSO a celý konstrukt byl rozdělen na dvě části - celý protein PIN1a a intracelulární úsek proteinu PIN1 - PIN1b. V 0,5ml mikrozkušavkách pro PCR bylo smícháno: 30,5 μ l dH₂O, 5 μ l pufru pro polymerasu; 1,5 μ l 100mM MgSO₄; 1,5 μ l 10mM dNTPs, 5 μ l 5 μ M přímých primerů PIN1a_FW pro konstrukt PIN1a a PIN1b_FW pro konstrukt PIN1b, 5 μ l 5 μ M reverzních primerů PIN1a_REV pro konstrukt PIN1a a PIN1b_REV pro konstrukt PIN1b, 1 μ l templátu (c = 25 ng/ μ l); 0,5 μ l DeepVent DNA polymerasy.

PCR amplifikace proběhla v termocykleru s následujícím programem:

- 1) 5 min při 94 °C
- 2) 30×: 30 s při 94 °C, 30 s při 50 °C, 2 min při 72 °C
- 3) 8 min při 72 °C
- 4) 4 °C do doby vyjmutí zkumavek z termocykleru

5.1.2 Agarosová elektroforéza [23]

Kontrola PCR produktu byla provedena pomocí agarosové elektroforézy v 1% gelu. Gel byl připraven smícháním 0,65 g agarosy a 65 ml 1× konc. TAE pufru v Erlenmeyerově baňce. Směs byla povařena v mikrovlnné troubě po dobu 1,5 min a po zchladnutí na teplotu přibližně 50 °C byly ke směsi přidány 3 μ l barviva GoodView. Gel byl nalit do elektroforetické vany, do něj byl vložen hřebínek a byl ponechán ztuhnout. Gel byl přelit 200 ml dH₂O a do prostoru elektrod bylo nalito 60 ml TAE pufru 1× konc. k anodě a 180 ml TAE pufru 1× konc. ke katodě. Do jamek gelu byl nanesen vzorek vzniklý smícháním 5 μ l PCR produktu a 1 μ l STOP pufru, a dále po 5 μ l 100bp a 1kb DNA standardů. Elektroforéza probíhala při 180 V po dobu 15 min. Fragmenty byly pozorovány pod UV lampou při 312 nm.

5.1.3 Preparativní agarosová elektroforéza

Gel pro agarosovou elektroforézu byl připraven dle postupu uvedeného v odstavci 5.1.2. Do jamek gelu byly nanесeny vzorky vzniklé smícháním 45 μ l PCR produktů s 5 μ l STOP pufru. Použity byly pouze PCR produkty konstruktů PIN1a - PIN1a₁, u kterého proběhla PCR reakce bez použití DMSO a PIN1a₂, u kterého byl do reakční směsi pro PCR amplifikaci přidán DMSO. Objem 50 μ l obou vzorků byl rozdělen vždy do dvou jamek pro každý vzorek. Elektroforéza probíhala při 180 V po dobu 15 min. Fragменты o délce přibližně 1800 bp byly vyříznuty z gelu a zváženy.

5.1.4 Extrakce DNA z agarosového gelu [24]

Pro extrakci DNA z gelu byla použita souprava JETQUICK Gel Extraction Spin Kit/250 od firmy Genomed. K vyříznuté části gelu (pouze konstrukt PIN1a) o hmotnosti 0,4 g bylo přidáno 1,2 ml roztoku L1. Dále bylo postupováno dle návodu výrobce. Vzorek byl postupně po 600 μ l nanášen na kolonku. Eluce DNA z kolonky proběhla pomocí 50 μ l dH₂O přehřáté na 50 °C do čisté mikrozkuмavky.

5.1.5 Extrakce DNA srážením v ethanolu

Srážením v ethanolu byl extrahován pouze PCR produkt PIN1b. Do dvou mikrozkuмavek bylo smícháno 45 μ l PCR produktu PIN1b, 5 μ l 3M octanu sodného, 125 μ l 100% ethanolu. Roztok byl promíchán a vložen do mrazáku (-20 °C). Následně byly mikrozkuмavky se vzorkem centrifugovány 5 min při 15000 \times g, 12 °C. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 50 μ l 70% ethanolu. Poté byl vzorek centrifugován 5 min při 15000 \times g, 12 °C. Supernatant byl opět odstraněn a peleta byla ponechána vyschnout v rotační vakuové odparce po dobu 3 min. Následně byla peleta resuspendována ve 14 μ l dH₂O.

5.1.6 Restrikční štěpení

Pro restrikční štěpení byly použity vzorky vzniklé extrakcí DNA z gelu a extrakcí DNA srážením v ethanolu. Byly smíchány reakční směsi o celkovém objemu 20 μ l pro PIN1a i pro PIN1b, které obsahovaly 2 μ l NEB1 restrikčního pufru (10 \times konc.), 2 μ l BSA (10 mg/ml), 1 μ l AgeI, 1 μ l KpnI, 14 μ l vzorku PIN1a nebo PIN1b. Směsi byly ponechány inkubovat 30 min při 37 °C.

5.1.7 Přečištění inzertů [24]

Přečištění inzertů bylo provedeno pomocí soupravy JETQUICK Gel Extraction Spin Kit/250 dle návodu výrobce. K inzertům bylo přidáno 300 μ l roztoku L1. Inzerty byly z kolonky eluovány 50 μ l dH₂O přehřáté na 70 °C.

5.1.8 Ligace inzertů do vektorů pTW5 a pTW5sec

Ligační směsi o celkovém objemu 20 μ l byly připraveny pro oba konstrukty. Bylo smícháno 1 μ l T4 DNA ligasy, 4 μ l linearizovaného plasmidu pTW5 ($c = 50$ ng/ μ l), 6 μ l inzertu PIN1a nebo PIN1b, 2 μ l pufru pro T4 DNA ligasu a 7 μ l dH₂O. Pro konstrukt PIN1b byla připravena další ligační směs obsahující 4 μ l linearizovaného plasmidu pTW5sec. Směsi byly inkubovány při pokojové teplotě po dobu 50 min.

5.1.9 Transformace kompetentních bakterií tepelným šokem

Nejprve byly kompetentní bakterie *Escherichia coli* DH5 α , které byly uchovávány v mrazáku při -80 °C, ponechány rozmraznout na ledu. Poté bylo ke každé ligační směsi v mikrozkuhavce přidáno 100 μ l bakteriální suspenze. Směs byla inkubována 30 min na ledu. Následně byla mikrozkuhavka ponořena přesně na 1 min do vodní lázně přehřáté na 42 °C a poté opět vrácena na led. Ke směsi byl přidán 1 ml LB media přehřátého na 37 °C, směs byla inkubována 1,5 h při 37 °C a dále centrifugována 1 min při 4000 \times g, 25 °C. Většina supernatantu byla odstraněna, peleta byla resuspendována ve zbytku supernatantu a následně bakteriologickou kličkou rozetřena na Petriho misku s LB agarem (s obsahem 100 μ g/ml ampicilinu) přehřátou na 37 °C. Petriho misky byly inkubovány 24 h při 37 °C.

5.1.10 PCR z kolonií

Na Petriho misce byla vybrána 1 kolonie pro plasmid pTW5_PIN1b, 6 kolonií pro pTW5_PIN1a a 5 kolonií pro pTW5sec_PIN1b. Kolonie byly pomocí pipetovací špičky přeneseny do 0,5ml PCR zkuhavky a resuspendovány v 6 μ l sterilní dH₂O. Stejná pipetovací špička byla vždy propláchnuta ve směsi 5 ml LB media se 100 μ g/ml ampicilinu v 50ml zkuhavkách s víčkem, které byly následně inkubovány na třepačce 16 h při 220 ot./min, 37 °C.

Do PCR zkumavek byly přidány 2 μ l 5 μ M reverzních primerů PIN1a_REV do mikrozkušavky s konstruktem PIN1a a PIN1b_REV do mikrozkušavek s konstruktem PIN1b, dále 2 μ l 5 μ M přímého primeru pTT_FW do všech mikrozkušavek a 10 μ l 2 \times konc. PPP PCR mastermixu. PCR reakce proběhla v termocykleru s následujícím programem.

- 1) 5 min při 94 °C
- 2) 20 \times : 30 s při 94 °C; 30 s při 52 °C; 1,5 min při 72 °C
- 3) 10 min při 72 °C
- 4) 4 °C do vyjmutí mikrozkušavek

Kontrola PCR produktů byla provedena pomocí agarosové elektroforézy (viz 5.1.2). Do jamek gelu bylo pipetováno vždy 20 μ l PCR produktu a po 5 μ l 100bp a 1kb DNA standardů. Elektroforéza probíhala 15 min při 200 V.

5.1.11 Příprava plasmidové DNA [25]

Bakteriální kultury v 50ml zkumavkách s víčkem, odpovídající klonům, které dle PCR z kolonií obsahují plasmid s inzertem (jedna pro pTW5_PIN1b a pro pTW5sec_PIN1b a tři pro pTW5_PIN1a), byly centrifugovány 1 min při 15000 \times g, 25 °C. Supernatant z každé mikrozkušavky byl odstraněn, peleta resuspendována v 1 ml TES pufru a přenesena do mikrozkušavek. Mikrozkušavky byly centrifugovány 1 min při 15000 \times g, 25 °C, supernatant byl odstraněn a dále byla při přípravě miniprepu použita souprava High-Speed Plasmid Mini Kit. Při přípravě bylo postupováno dle návodu výrobce. DNA byla eluována 50 μ l dH₂O předehřáté na 70 °C.

5.1.12 Sekvenování DNA

Do 0,2ml PCR mikrozkušavky byly pipetovány vždy 2 μ l plasmidu (pTW5_PIN1b, pTW5sec_PIN1b i pTW5_PIN1a ze všech využitých bakteriálních kultur), 1 μ l 5 μ M přímého sekvenačního primeru pTT_FW a 5 μ l dH₂O. Pro přípravu druhé sekvenační reakce byly také do 0,2ml PCR mikrozkušavky pipetovány 2 μ l plasmidu, 1 μ l 5 μ M reverzního sekvenačního primeru pTW5seq_REV a 5 μ l dH₂O. Sekvenování bylo provedeno v Laboratoři sekvenace DNA PřF UK. Kvůli velkému

počtu páru bazí v konstruktu PIN1a byla provedena druhá sekvenace pro jeden vzorek s použitím vnitřních primerů. Do reakcí byly pipetovány vždy 2 μ l plasmidu, 5 μ l dH₂O a 1 μ l 5 μ M přímého primeru PIN1b_FW nebo 5 μ M reverzního primeru PIN1b_REV.

5.2 Příprava zásobního množství plasmidové DNA

5.2.1 Trasformace a kultivace *E.coli*

Nejprve byly kompetentní bakterie *Escherichia coli* DH5 α , které byly uchovávány v mrazáku při -80 °C, ponechány rozmraznout na ledu. Ke 200 μ l bakterií bylo přidáno 5 μ l plasmidu (pTW5_PIN1b a pTW5_PIN1a) a k 70 μ l bakterií bylo přidáno 2,5 μ l plasmidu (pTW5sec_PIN1b). Směsi byly inkubovány 30 min při 0 °C, následně byly ponořeny na 1 min do vodní lázně o teplotě 42 °C a poté opět přeneseny na led. Ke směsím byl pipetován vždy 1 ml LB média předehřátého na 37 °C. Následovala inkubace po dobu 1 h při 37 °C. Po inkubaci byla směs přenesena do 500 ml LB média se 100 μ g/ml ampicilinu předehřátého na 37 °C v 2l Erlenmeyerových baňkách. Kultury byly třepány 15 hod při 220 ot./min, 37 °C. V případě plasmidu pTW5sec_PIN1b po 1h inkubaci při 37 °C při transformaci následovala centrifugace 1 min při 4000 \times g, 25 °C, většina supernatantu byla odstraněna a peleta byla resuspendována ve zbytku média a suspenze byla rozetřena na Petriho misky s LB agarem s ampicilinem předehřáté na 37 °C. Misky byly inkubovány 24 h při 37 °C. Vzniklé kolonie byly rozmíchány v 5 ml LB média a přeneseny do 500 ml LB média se 100 μ g/ml ampicilinu předehřátého na 37 °C. Následovala produkce popsaná výše.

5.2.2 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA [26]

Transformované bakteriální kultury byly dvakrát centrifugovány 30 min při 4500 \times g, 4 °C a pelety byly dále resuspendovány ve 20 ml TES pufru a přeneseny do 30ml kyvet typu Oak Ridge. Kultury byly dále centrifugovány 10 min při 14000 \times g, 4 °C. Dále byla použita souprava PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kit a bylo postupováno dle návodu výrobce. Do každé kyvety bylo přidáno 9 ml resuspendačního pufru R3 a pelety byly resuspendovány. Poté bylo přidáno 9 ml lyzačního pufru L7 a každá kyveta byla převrácením důkladně promíchána a ponechána 5 min stát při pokojové teplotě. Po přidání 9 ml precipitačního pufru N3 byly kyvety krátce protřepány a dvakrát po 10 min centrifugovány při 14000 \times g, 25 °C. Supernatanty byly

přeneseny na kolony, které byly předem ekvilibrovány pomocí 30 ml ekvilibračního pufru. Po prokapání veškerého supernatantu byla každá kolona promyta dvakrát 30 ml Wash pufru a poté 15 ml elučního pufru. Eluce z kolon byla provedena do čistých 30ml zkumavek. K roztokům bylo pipetováno 10,5 ml předchlazeného isopropanolu a směsi byly centrifugovány 30 min při $20000 \times g$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. K peletám bylo pipetováno 5 ml 70% předchlazeného EtOH a pelety byly centrifugovány 5 min při $15300 \times g$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelety byly ponechány krátce vyschnout ve vakuové odparce a k odparku byl pipetován 1 ml sterilní dH₂O. Z roztoků bylo odebráno 10 μl pro zjištění přesné koncentrace a čistoty plasmidové DNA.

5.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

Měření koncentrace DNA a její čistoty bylo provedeno spektrofotometricky. Měřena byla plasmidová DNA, která byla 300 \times zředěna v dH₂O. Koncentrace DNA byla vypočítána ze vztahu, který uvažuje, že pokud má roztok DNA při 260 nm absorpenci rovnou jedné, je jeho koncentrace přibližně 50 $\mu\text{g/ml}$. Pokud je poměr A_{260}/A_{280} roven přibližně 1,8, jedná se o čistou DNA. Pokud je tento poměr nižší, tak pravděpodobně došlo ke kontaminaci plasmidové DNA proteiny. V případě, že poměr převyšuje hodnotu 2,0, v roztoku se kromě DNA vyskytuje také RNA.

5.3 Expresní test

5.3.1 Počítání buněčné hustoty HEK293 buněčné linie

Pomocí automatické pipety bylo odebráno 20 μl promíchané buněčné suspenze HEK293 buněčné linie, která byla v mikrozkuhavce smíchána s 20 μl 0,4% trypanové modři v PBS-TK pufru. Po 5min inkubaci bylo na hemocytometr nanášeno 20 μl této suspenze. Pod mikroskopem byly spočítány živé a mrtvé buňky. Počet buněk byl podělen počtem spočítaných čtverců a vynásoben faktorem $2 \cdot 10^4$, aby odpovídal jednotce 10^6 ml^{-1} . Viabilita byla vyjádřena jako procento živých buněk v suspenzi.

5.3.2 Transfekce HEK293 buněčné linie

Transfekovány byly dvě buněčné linie - HEK293T a HEK293-6E. V 15 ml média F17 se nacházelo $33 \cdot 10^6$ buněk HEK293T a $14 \cdot 10^6$ buněk HEK293-6E. Pro

transfekci obou buněčných linií byl použit 1 µg plasmidu na $1 \cdot 10^6$ buněk. Transfekčním činidlem byl lineární 25kDa polyethylenimin v hmotnostním poměru DNA:IPEI = 1:3

K transfekci buněčné linie HEK293T plasmidem pTW5_PIN1a o koncentraci 1,305 µg/µl byla připravena transfekční směs skládající se z 25,2 µl roztoku plasmidové DNA a 2,2 ml sterilního PBS-TK, která byla pomocí 0,22 µm sterilního filtru a injekční stříkačky zfiltrována do plastové zkumavky. Následně bylo přidáno 99 µl IPEI a směs byla ihned krátce protřepána. Takto připravená transfekční směs byla ponechána 5 min inkubovat a poté byla přidána k 15 ml buněčné suspenze.

Stejným postupem byly připraveny další transfekční směsi, pouze s rozdílným složením. Transfekční směs pro transfekci buněčné linie HEK293T plasmidem pTW5_PIN1b ($c = 1,44$ µg/µl) obsahovala 22,9 µl plasmidu; 2,2 ml sterilního PBS-TK a 99 µl IPEI. Transfekční směs pro transfekci buněčné linie HEK293-6E plasmidem pTW5_PIN1a ($c = 1,305$ µg/µl) obsahovala 10,7 µl plasmidu; 2,2 ml sterilního PBS-TK a 42 µl IPEI. Transfekční směs pro transfekci buněčné linie HEK293-6E plasmidem pTW5_PIN1b ($c = 1,44$ µg/µl) obsahovala 9,72 µl plasmidu; 2,2 ml sterilního PBS-TK a 42 µl IPEI.

Suspenze buněk byly ponechány 4 h třepat v inkubátoru při 130 ot./min, 37 °C, 5% CO₂. Poté byla doplněna v poměru 1:1 médiem ExCELL293 a 0,3 ml směsi streptomycinu a penicilinu (10 mg/ml každý). Produkce byla po třech dnech ukončena, byla spočítána viabilita buněk a suspenze byla centrifugována v plastových kyvetách Oak Ridge 5 min při $200 \times g$, 25 °C. Z média bylo odebráno vždy 10 µl do mikrozkušavky, zbytek byl přenesen do 50ml zkumavek s víčkem a zmražen. Peleta byla resuspendována v 10 ml PBS-TK a centrifugována v polypropylenové zkumavce po dobu 5 min při $200 \times g$, 25 °C. Část pelety byla odebrána do mikrozkušavky a zbytek byl zmražen.

5.3.3 SDS elektroforéza

Pro SDS elektroforézu byl připraven 15% separační gel a zaostřovací gel. Pro přípravu separačního gelu bylo smícháno 2,7 ml dH₂O, 6 ml AA, 3 ml Tris pufru o pH 8,8; 120 µl 10% SDS, 6 µl TEMED a 100 µl APS. Zaostřovací gel byl připraven smícháním 2,1 ml dH₂O; 0,75 ml AA, 375 µl Tris pufru o pH 6,8; 30 µl 10% SDS, 4 µl TEMED, 20 µl APS a 120 µl 1× koncentrovaného neredukujícího vzorkového pufru.

Množství jsou uvedena pro tři gely. Vzorky byly připraveny smícháním 10 µl média s 10 µl 2× koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru a smícháním malé části pelety s 10 µl 2× koncentrovaného redukujícího pufru. Poté byly 5 min povařeny ve vodní lázni a do jamek bylo pipetováno vždy 10 µl vzorku. Do jamek bylo dále naneseno 5 µl Pink protein standardu a 10 µl pozitivní kontroly proteinu LLT1 o koncentraci 0,1 µg/µl smíchané s 2× koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrem. Elektroforéza probíhala 1 h při 200 V. Po skončení elektroforézy byl proveden elektropřenos a poté byl gel barven asi 30 min v barvicí lázni a oplachován odbarvovacím roztokem do odbarvení pozadí gelu.

5.3.4 Elektropřenos

Po ukončení elektroforézy byl gel ponořen do přenosového pufru. Na aparaturu pro elektropřenos byl vložen filtrační papír navlhčený v přenosovém pufru. Na filtrační papír byla položena nitroceluloseová membrána, která byla též navlhčena v přenosovém pufru. Na membránu byl položen gel z elektroforézy a ten byl dále překryt filtračním papírem, opět navlhčeným v přenosovém pufru. Vše bylo překryto vrchní částí aparatury pro elektropřenos. Elektropřenos probíhal při 3,5 mA/cm² po dobu 1 h.

5.3.5 Imunodetekce

Po ukončení elektropřenosu byla membrána dvakrát oplachována v TBS po dobu 5 minut. Poté byla 45 min inkubována v blokovacím pufru (1% HSA v TBS) při 4 °C. Membrána byla oplachována dvakrát v TBSTT a jednou v TBS, vždy po dobu 5 min. Dále byla vložena do primární protilátky (myší protilátka PentaHis mAb proti histidinové kotvě v 0,5% HSA v TBS) a inkubována přes noc (cca 16 h) při 4 °C. Následoval dvakrát oplach membrány v TBSTT a jednou v TBS po dobu 5 min. Membrána byla inkubována se sekundární protilátkou (polyklonální králičí protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s HRP ředěná 1:20000 a polyklonální kozí protilátka proti myšimu IgG konjugovaná s AP ředěná 1:10000 v 1% BSA) po dobu 1 h při 4 °C. Membrána byla dvakrát oplachována v TBSTT po dobu 5 min.

Dále byla membrána umístěna na podkladovou desku, přelita směsí 3 ml ECL1 a 3 ml ECL2 roztoků a inkubována 1 min. Roztoky byly slity a membrána na podkladové desce byla zabalena do potravinové folie. Deska s membránou byla vložena do

fotografické kazety a překryta fotografickým filmem. Kazeta byla uzavřena a následovaly čtyři expozice - 20 s; 1,5 min, 3 min a 30 s. Fotografické filmy byly vloženy do vývojky, poté do ustalovače a po vyvolání fotografií opláchnuty pod tekoucí vodou a ponechány uschnout. Nitroceluloseová membrána byla inkubována ve směsi 10 ml pufru pro AP, 40 μ l NBT a 40 μ l BCIP do vybarvení signálů.

5.4 Purifikace proteinů

Pelety buněčných suspenzí linie HEK293T obsahujících konstrukty PIN1a a PIN1b byly resuspendovány v 8 ml PBS a sonikovány na 20% výkon 5 \times po dobu 30 s a průběžně ochlazovány ledem. Byly odebrány vždy 2 μ l vzorku. Roztoky byly 10 min centrifugovány v plastových kyvetách při 20000 \times g, 4 °C. Pelety (nerozpustná frakce) byly resuspendovány ve 150 μ l dH₂O. Supernatanty (rozpustná frakce) byly použity k dalšímu zpracování.

Po dokončení izolace proteinu z membrány (viz 5.4.1) a chelatační chromatografie (viz 5.4.2) byla se všemi průběžně získanými vzorky provedena SDS elektroforéza (viz 5.3.3) v 10% gelu, který byl připraven z 3,15 ml dH₂O; 2,65 ml AA, 2 ml pufru o pH 8,8; 80 μ l 10% SDS, 30 μ l APS a 0,4 μ l TEMED. Tyto objemy byly použity pro přípravu dvou gelů. Pro SDS elektroforézu byly použity tyto vzorky: vzorky PIN1a a PIN1b odebrané po homogenizaci buněk ultrazvukem - 2 μ l vzorku, 10 μ l 2 \times redukujícího vzorkového pufru, 8 μ l dH₂O; vzorky nerozpustné frakce PIN1a a PIN1b - 2 μ l vzorku, 10 μ l 2 \times redukujícího vzorkového pufru, 8 μ l dH₂O; vzorky rozpustné frakce PIN1a a PIN1b - 10 μ l vzorku, 10 μ l 2 \times redukujícího vzorkového pufru; vzorek proteinu PIN1a izolovaného z membrány - 5 μ l vzorku, 5 μ l dH₂O, 10 μ l 2 \times redukujícího vzorkového pufru; vzorek proteinu PIN1b izolovaného chelatační chromatografií - 10 μ l vzorku, 10 μ l 2 \times redukujícího vzorkového pufru. Dále byl proveden elektropřenos a imunodetekce (viz 5.3.4 a 5.3.5).

5.4.1 Izolace proteinu z membrány

Rozpustná frakce (supernatant) obsahující konstrukt PIN1a byla přelita do kyvety a centrifugována v ultracentrifuze 1h 15 min při 60000 \times g, 4 °C. Peleta byla přenesena do mikrozkuřavky a resuspendována v 90 μ l dH₂O a 10 μ l 10% SDS

zahříváním na 40 °C, sonikací v ultrazvukové lázni a pipetou. Pro orientační stanovení koncentrace proteinu bylo použito činidlo dle Bradfordové.

5.4.2 Chelatační chromatografie

Rozpustná frakce obsahující konstrukt PIN1b byla přenesena do 50ml zkumavky s víčkem, do které bylo přidáno 0,25 ml nosiče pro chelatační chromatografii Talon. Směs byla inkubována 1 h 15 min na třepačce při 130 ot./min a pokojové teplotě. Poté byla směs centrifugována 4 min při $700 \times g$, 14 °C. Talon byl opláchnut 5 ml PBS a opět centrifugován 4 min při $700 \times g$, 14 °C. Následoval oplach 5 ml PBS s imidazolem a opět centrifugace 4 min, $700 \times g$, 14 °C. Supernatant byl přelit do polypropylenové zkumavky a přefiltrován přes 0,22 μm filtr pomocí injekční stříkačky. Supernatant byl pomocí koncentrátoru zakonzentrován na 100 μl centrifugací při $4000 \times g$ za pokojové teploty. Orientační stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno dle Bradfordové.

5.4.3 SDS elektroforéza pro hmotnostní spektrometrii

Byl připraven 12% separační gel a zaostřovací gel. Separační gel byl připraven smícháním 1,3 ml dH₂O; 1,6 ml AA, 1 ml pufru o pH 8,8; 40 μl 10% SDS, 40 μl APS a 2 μl TEMED. Množství jsou uvedena pro jeden gel. Byly použity tyto vzorky: vzorek proteinu PIN1b po izolaci chelatační chromatografií - 16 μl vzorku, 4 μl 5 \times redukujícího vzorkového pufru; vzorek nerozpustné frakce PIN1b - 0,25 μl vzorku, 7,75 μl dH₂O, 8 μl 2 \times redukujícího vzorkového pufru; vzorek nerozpustné frakce PIN1a - 0,5 μl vzorku, 7 μl dH₂O; 7,5 μl 2 \times redukujícího vzorkového pufru; vzorek proteinu PIN1 izolovaného z membrány - 1,25 μl vzorku; 6,25 μl dH₂O; 7,5 μl 2 \times redukujícího vzorkového pufru. Elektroforéza byla provedena dle odstavce 5.3.3.

5.4.4 Vsádková chelatační chromatografie

Pro tuto metodu byla použita produkce z transfekce buněčné linie HEK293T plasmidem pTW5sec_PIN1b. Tato transfekce proběhla ve 100 ml buněčné suspenze obsahující $2,12 \cdot 10^6$ buněk a probíhala dle standardního postupu (viz 5.3.2). Transfekční směs byla připravena smícháním 161 μl plasmidu pTW5sec_PIN1b ($c = 1,245 \mu g/\mu l$), 5 ml PBS-TK a 600 μl IPEI. Po 5 dnech byla produkce sklizena (viz 5.3.2).

Médium bylo centrifugováno 30 min při $4500 \times g$ 4 °C v 250ml plastové kyvetě. Supernatant byl zfiltrován za sníženého tlaku přes 0,22 μ m filtr a dále přenesen do 2l Erlenmeyerovy baňky a doplněn na 200 ml PBS (poměr 1:1). Do baňky byly přidány cca 3 ml nosiče pro chelatační chromatografii Talon. Směs byla třepána 1 h při 120 ot./min při pokojové teplotě. Poté byla směs přenesena na kolonu s fritou a promyta PBS pufrem. Následovala eluce do čisté polypropylenové zkumavky pomocí přidavku 4×4 ml PBS pufru s imidazolem. Eluát byl při $4500 \times g$, 4 °C zakoncentrován v koncentrátorech na objem 100 - 200 μ l.

5.4.5 Gelová permeační chromatografie

Na HPLC systém byla připojena kolona Superdex 200 10/300 GL o tlakovém limitu 1,5 MPa. Pomocí injekční stříkačky byl proveden nástřik vzorku. Průtok mobilní fáze kolonou činil 0,5 ml/min. Frakce byly jímány do mikrozkuvek.

5.5 Akumulace auxinu

Pro tuto metodu byly použity produkce buněk linie HEK293T transfekovaných jednak plasmidem pTW5_PIN1a a dále směsí plasmidů pTW5_GFP a pTW5_SEAP, které nesou geny pro zelený fluorescenční protein a sekretovanou alkalickou fosfatase, jako pozitivní kontrola účinnosti transfekce a negativní kontrola akumulace auxinu. Transfekce byla provedena dle postupu v odstavci 5.3.2. Suspenze o objemu 75 ml obsahovala $150 \cdot 10^6$ buněk. Transfekční směs obsahovala 115 μ l plasmidu pTW5_PIN1a ($c = 1,305 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 7 ml PBS-TK a 600 μ l IPEI. Transfekční směs pro kontrolní produkci obsahovala 3 μ l pTW5_GFP, 54 μ l pTW5_SEAP, 7 ml PBS-TK a 600 μ l IPEI.

Po 3 dnech bylo odebráno vždy $42 \cdot 10^6$ buněk. Suspenze byly centrifugovány 5 min při $200 \times g$, 25 °C a pelety byly resuspendovány ve 40 ml PBS(5,5). Směs byla opět centrifugována a resuspendována ve 20 ml PBS(5,5). Ke 20 ml kultury v PBS(5,5) bylo přidáno 10 μ l $^3\text{HIAA}$ ($c = 10 \text{ nmol/l}$). Poté bylo odebráno vždy $4 \times 0,5$ ml směsi, další odběry probíhaly vždy přesně po 5 min (tj. v čase 5 - 10 - 15 - 20 - 25 - 30 - 50 min). Odebraná suspenze byla vždy ihned odsáta na filtru a filtr byl vložen do scintilační nádoby. Do scintilační nádoby bylo přidáno 0,5 ml ethanolu a filtr byl 30 min inkubován. Poté byly do nádoby přidány 4 ml scintilační směsi. Roztok byl inkubován 20 min za stálého třepání. Poslední odběr (tj. po 50 min) činil 7 ml a byl

k němu přidán 1 ml ethanolu. Všechny vzorky byly připraveny a měřeny v dubletech. Scintilační nádoby byly vloženy do kazet a aktivita byla měřena scintilátorem vždy po dobu 2 min. Tato práce probíhala ve spolupráci s RNDr. Martinou Laňkovou, PhD. v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin v Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

5.6 Imunofluorescence

Pro tuto metodu byla použita produkce buněk linie HEK293T a HEK293-6E. Buňky byly transfekovány plasmidem pTW5_PIN1a. Postup transfekce viz 5.3.2. Hustota buněčné suspenze HEK293T byla $35,25 \cdot 10^6$ a HEK293-6E byla $23,26 \cdot 10^6$. Transfekční směs pro linii HEK293T obsahovala 27 μ l plasmidu ($c = 1,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), 2 ml PBS-TK, $10\times$ koncentrovaný IPEI v poměru 1:3. Transfekční směs pro linii HEK293-6E obsahovala 17,9 μ l plasmidu, 2 ml PBS-TK a $10\times$ koncentrovaný IPEI v poměru 1:3.

5.6.1 Permeabilizované buňky [27]

Pokus probíhal 48 h po transfekci. Byl odebrán 1 ml buněk z obou buněčných linií transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a i kontrolních buněk netransfekovaných. Médium bylo centrifugováno 1 min při $2000 \times g$. Peleta byla resuspendována v 0,5 ml 4% paraformaldehydu v PBS-TK a inkubována 30 min při pokojové teplotě. Suspenze byla centrifugována opět 1 min při $2000 \times g$ a peleta byla dvakrát opláchnuta 0,5 ml PBS-TK (centrifugace 1 min při $2000 \times g$). Následovala inkubace ve 200 μ l 0,01% roztoku Triton X-100 v PBS-TK a 1% BSA po dobu 30 min při pokojové teplotě a centrifugace 1 min při $2000 \times g$. Peleta byla resuspendována v roztoku 0,5 ml primární protilátky „Goat polyclonal IgG anti-PIN1“ v 1% BSA v PBS-TK ředěné v poměru 1:250 a inkubována 1 h při pokojové teplotě. Poté byla peleta opláchnuta $3\times$ v 0,5 ml 1% BSA v PBS-TK, roztok byl centrifugován 1 min při $2000 \times g$ a peleta byla resuspendována v 0,5 ml sekundární protilátky „Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG“ v PBS-TK ředěné v poměru 1:1000. Směs byla inkubována 30 min při pokojové teplotě, centrifugována 1 min při $2000 \times g$ a peleta byla $3\times$ opláchnuta v PBS-TK. Na podložní sklo bylo nanášeno několik kapek suspenze a ta byla dále pozorována pod konfokálním mikroskopem LSM 5 DUO ($\times 40$ C-Apochromat objektiv ($NA = 1,25$)). Tato práce

probíhala ve spolupráci s RNDr. Martinou Laňkovou, PhD. v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin v Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

5.6.2 Nepermeabilizované buňky [27]

Pokus probíhal 48 h po transfekci. Byl odebrán 1 ml buněk z obou buněčných linií transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a i kontrolních netransfekovaných. Médium bylo centrifugováno 1 min při $2000 \times g$. Peleta byla resuspendována v 0,5 ml 1% paraformaldehydu v PBS-TK a inkubována 10 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace opět 1 min při $2000 \times g$ a peleta byla dvakrát opláchnuta 0,5 ml PBS-TK (centrifugace 1 min při $2000 \times g$). Peleta byla resuspendována v roztoku 0,5 ml primární protilátky „Goat polyclonal IgG anti-PIN1“ v 1% BSA v PBS-TK ředěné v poměru 1:250 a inkubována 1 h při pokojové teplotě. Poté byla peleta opláchnuta $3 \times$ v 0,5 ml 1% BSA v PBS-TK, roztok byl centrifugován 1 min při $2000 \times g$ a peleta byla resuspendována v 0,5 ml sekundární protilátky „Alexa Fluor 488 donkey anti-goat IgG“ v PBS-TK ředěné v poměru 1:1000. Roztok byl inkubován 30 min při pokojové teplotě, centrifugován 1 min při $2000 \times g$ a peleta byla $3 \times$ opláchnuta v PBS-TK. Na podložní sklo bylo nanášeno několik kapek suspenze a ta byla dále pozorována pod konfokálním mikroskopem LSM 5 DUO ($\times 40$ C-Apochromat objektiv (NA = 1,2 W)). Tato práce probíhala ve spolupráci s RNDr. Martinou Laňkovou, PhD. v Laboratoři hormonálních regulací u rostlin v Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

6 VÝSLEDKY

6.1 Příprava plasmidové DNA

Výchozím materiálem byl plasmid pJET_PIN1 poskytnutý RNDr. Martinou Laňkovou, Ph.D. z Laboratoře hormonálních regulací u rostlin Ústavu experimentální botaniky AV ČR, který byl restriktivně štěpen endonukleasami AgeI a KpnI (postup viz 5.1.6). Délka vyštěpeného inzertu byla ověřena agarosovou elektroforézou (5.1.2), DNA byla vyextrahována z agarosového gelu (5.1.4) a ligována do plasmidu pTW5 (obr. 7). Dále byla připravena plasmidová DNA (5.1.11) a její správnost byla ověřena sekvenováním (5.1.12).

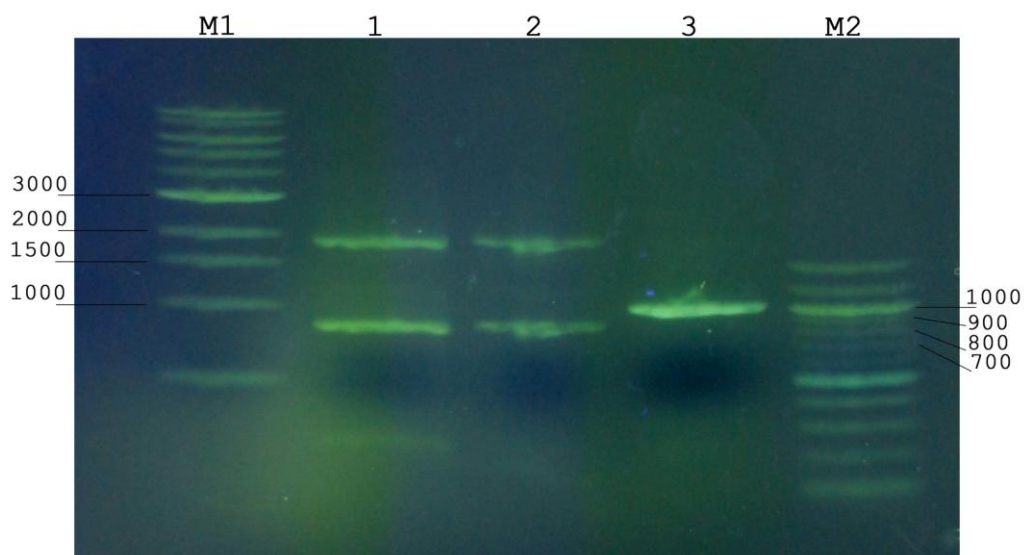
Výsledky sekvenace však prokázaly, že výchozí plasmid pJET_PIN1 obsahoval mezi restriktivními místy AgeI a KpnI také krátké úseky mRNA na obou koncích inzertu, což by při expresi v plasmidu pTW5 vedlo ke zcela jiné aminokyselinové sekvenci proteinu. Proto byl inzert dále upraven pomocí PCR amplifikace (5.1.1). Byly navrženy primery pro dva různé konstrukty proteinu PIN1 (obr. 8, str. 38) a to PIN1a, který pokrývá celou sekvenci PIN1 (ovšem bez úseků mRNA; délka inzertu 1866 bp) a PIN1b, pokrývající pouze dlouhou intracelulární smyčku PIN1 (délka inzertu 990 bp). Správnost PCR amplifikace byla ověřena agarosovou elektroforézou (obr. 9, str. 39)

```
TGATATTACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCAC
AGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCGCCGCCACCATGGGAACCGGTin
zertGGTACCACCATCACCAACATCACCAACACGGGTGATCAAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGT
GAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTT
```

Obr. 7: Okolí klonovacího místa plasmidu pTW5

Zeleně je vyznačeno místo štěpení enzymem AgeI, **modře** je vyznačeno místo štěpení enzymem KpnI, podtržené jsou sekvence nasedání sekvenačních primerů pTT_FW a pTW5seq_REV, **růžově** je vyznačena C-terminální histidinová kotva, **zeleně** je zvýrazněn start kodon a **červeně** je zvýrazněn stop kodon

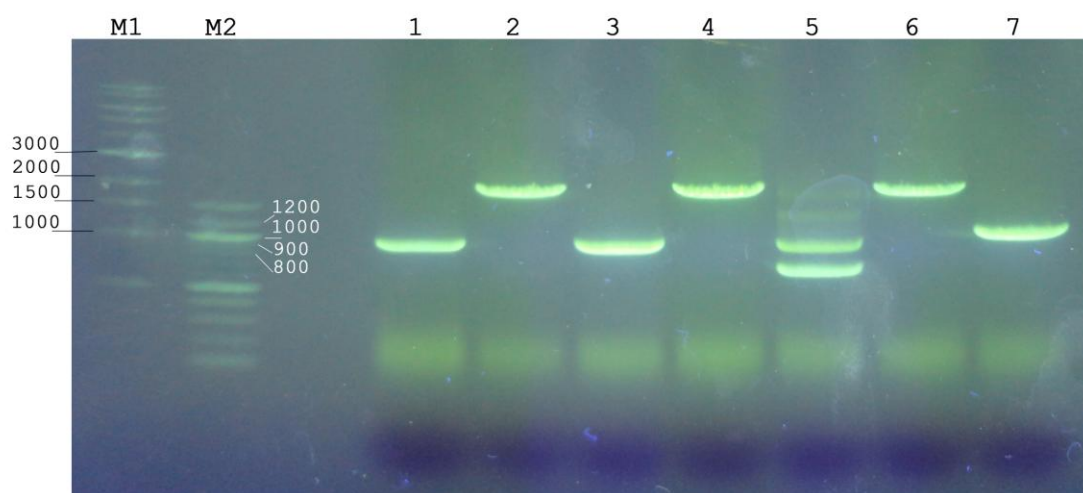
Zeleně je vyznačen start kodon, **červeně** stop kodon, černě je vyznačena transmembránová část PIN1, podtržená jsou místa nasedání primerů PIN1a_FW a PIN1a_REV, **oranžově** je vyznačena intracelulární doména PIN1 (konstrukt PIN1b) a podtržena jsou místa nasedání primerů PIN1b_FW a PIN1b_REV



Obr. 9: PCR amplifikace inzertů PIN1a a PIN1b

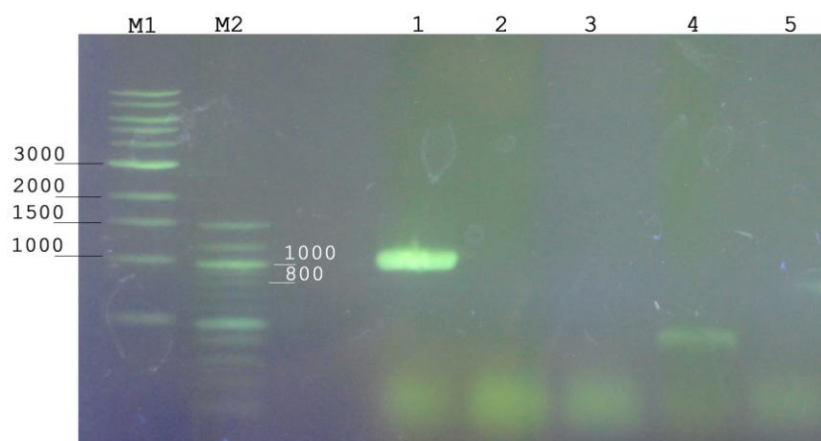
Dráha M1 představuje 1kb DNA standard, dráha M2 představuje 100bp DNA standard, v dráze 1 je PCR produkt PIN1a (očekávaná velikost 1866 bp), v dráze 2 je PCR produkt PIN1a (do směsi pro PCR byl přidán DMSO), v dráze 3 je PCR produkt PIN1b (očekávaná velikost 990 bp)

DNA získaná PCR amplifikací (pro PIN1a byl vyříznut vždy horní proužek o velikosti 1866 bp) byla štěpena restričními endonukleasami AgeI a KpnI (5.1.6), vzniklé inzerty byly přečištěny pomocí kitu (5.1.7) a použity pro přípravu ligační směsi (5.1.8). Inzerty byly ligovány do dvou druhů vektorů - inzert PIN1a pouze do vektoru pTW5, který neobsahuje sekreční signál a inzert PIN1b do vektorů pTW5 a pTW5sec, který obsahuje sekreční signál. Touto ligační směsí byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* DH5 α . Transformace byla uskutečněna tepelným šokem (5.1.9). Po kultivaci kolonií na LB agaru byla s několika z nich provedena PCR z kolonií (5.1.10; obr. 10 a 11, str. 40).



Obr. 10: PCR z kolonií, plasmidy pTW5_PIN1a a pTW5_PIN1b

Dráhy M1 a M2 představují 1kb a 100bp DNA standardy, dráhy 1 - 6 obsahují vzorek z PCR z kolonií pro PIN1a (očekávaná velikost 1866 bp), dráha 7 obsahuje vzorek z PCR z kolonií pro PIN1b (očekávaná velikost 990 bp)



Obr. 11: PCR z kolonií, plasmid pTW5sec_PIN1b

Dráhy M1 a M2 představují 1kb a 100bp DNA standardy, dráhy 1 - 5 obsahují vzorek z PCR z kolonií pro PIN1b (očekávaná velikost 990 bp)

Na základě provedené analýzy (obr. 10 a 11) byly vybrány klony 1 (obr. 11), 2, 4 a 6 (obr. 10), z nichž byla izolována plasmidová DNA (5.1.11), která byla sekvenována (5.1.12). Vzhledem k velkému počtu bazí konstruktů PIN1a bylo pro sekvenování použito také vnitřních primerů, tzn. primerů PIN1b_FW a PIN1b_REV,

obě sekvenace byly proloženy a tím byla ověřena správnost sekvence celého konstruktů PIN1a.

6.2 Velkoobjemová příprava plasmidové DNA

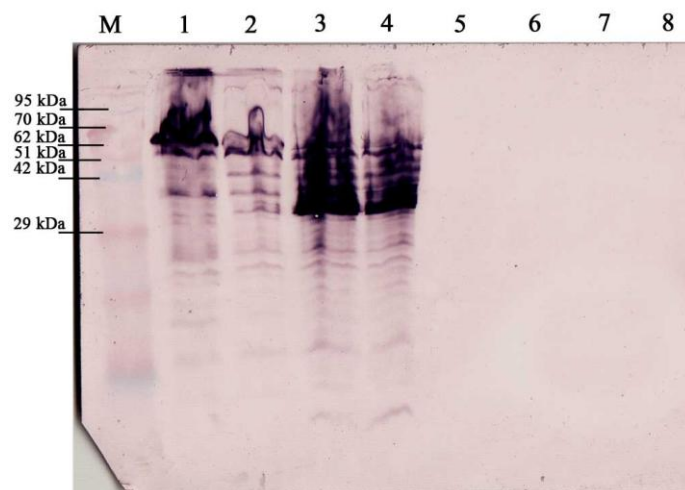
Byla provedena transformace kompetentních bakterií *E. coli* DH5 α tepelným šokem. Transformovanými bakteriemi bylo zaočkováno 500 ml LB média (5.2.1) Pro velkoobjemovou přípravu plasmidové DNA byly použity komerčně dodávané kolony. Celistvost izolovaných plasmidů byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy a jejich koncentrace a čistota byla stanovena spektrofotometricky (5.2.3, tab. 1). Plasmidová DNA byla pravděpodobně kontaminována proteiny, jelikož poměr A_{260}/A_{280} byl nižší než 1,8. Bílkoviny absorbují při 280 nm a DNA při 260 nm, tudíž při vyšší absorpci světla bílkoviny poměr A_{260}/A_{280} klesá.

Tab. 1: Stanovení koncentrace a čistoty plasmidové DNA

Plasmid	Koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Čistota
pTW5_PIN1a	1,305	1,530
pTW5_PIN1b	1,440	1,520
pTW5sec_PIN1b	1,245	1,509

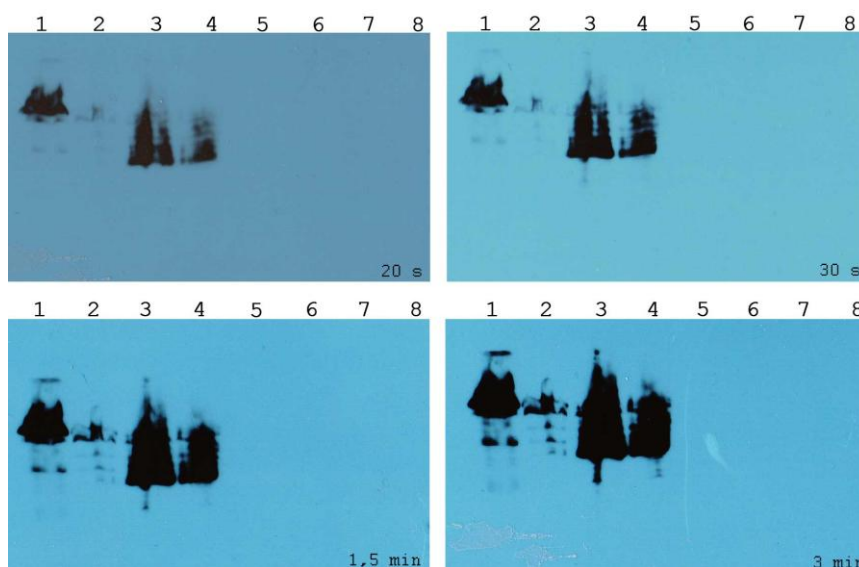
6.3 Expresní test

Plasmidy pTW5_PIN1a a pTW5_PIN1b byly transfekovány buněčné linie HEK293T a HEK293-6E (5.3.2). Po třech dnech byla produkce ukončena. Se vzorky buněk i médií byla provedena SDS elektroforéza (5.3.3) a elektropřenos proteinů z gelu na membránu (5.3.4). Přítomnost proteinů PIN1a (teoretická molekulová hmotnost 67 kDa) a PIN1b (teoretická molekulová hmotnost 35 kDa) byla prokázána imunodetekcí (5.3.5) pomocí protilátky proti histidinové kotvě jako primární protilátky a směsí sekundárních protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatase, které umožňují kolorimetrickou (obr. 12, str. 42) resp. chemiluminiscenční (obr. 13, str. 42) detekci signálu. Vzhledem k výraznějšímu signálu byla následná purifikace proteinu provedena pouze z buněčné linie HEK293T.



Obr. 12: Expresní test konstruktů PIN1a a PIN1b - kolorimetrická detekce

V dráze M se nachází standard, dráha 1 obsahuje vzorek z buněk HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a, dráha 2 obsahuje vzorek z buněk HEK293-6E transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a, dráha 3 obsahuje vzorek z buněk HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1b, dráha 4 obsahuje vzorek z buněk HEK293-6E transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1b, dráhy 5 - 8 představují vzorky odebrané z médií všech jmenovaných buněčných kultur.

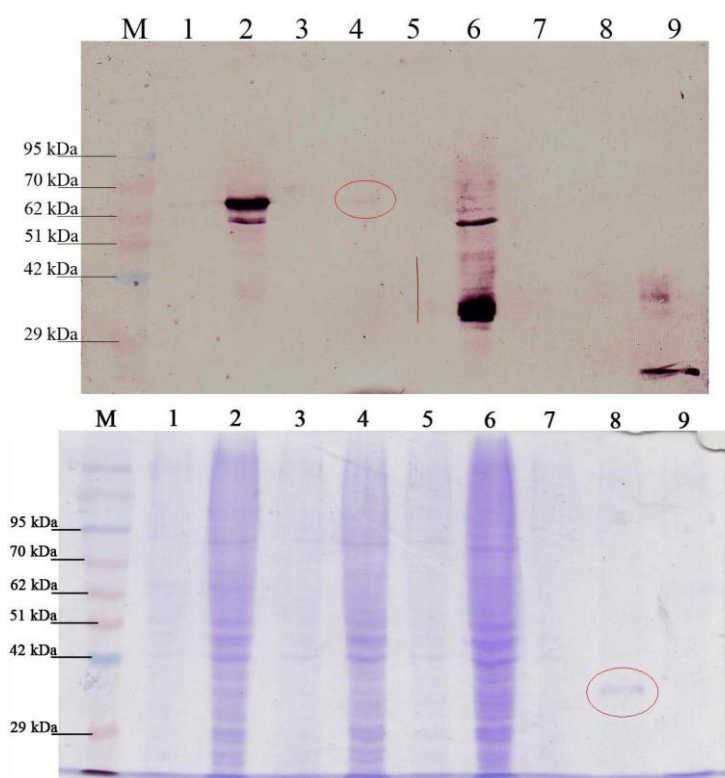


Obr. 13: Expresní test konstruktů PIN1a a PIN1b - chemiluminiscenční detekce

Dráha 1 obsahuje vzorek z buněk HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a, dráha 2 obsahuje vzorek z buněk HEK293-6E transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a, dráha 3 obsahuje vzorek z buněk HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1b, dráha 4 obsahuje vzorek z buněk HEK293-6E transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1b, dráhy 5 - 8 představují vzorky odebrané z médií všech jmenovaných buněčných kultur. Snímky byly pořízeny po expozici dlouhé 20 s, 30 s, 1,5 min a 3 min.

6.4 Purifikace proteinu

Byla provedena izolace proteinu PIN1a (5.4 - 5.4.1) z buněčné membrány buněk linie HEK293T a purifikace proteinu PIN1b z cytosolu buněk linie HEK293T (5.4.2). Během těchto postupů a po homogenizaci buněk sonikací byly průběžně odebírány vzorky. S těmito vzorky byla provedena SDS elektroforéza paralelně na dvou gelech. Jeden gel byl barven barvicím roztokem, druhý gel byl použit pro elektropřenos proteinů z gelu na membránu a proteiny PIN1a a PIN1b byly opět sledovány imunodetekcí (5.3.3 - 5.3.5).

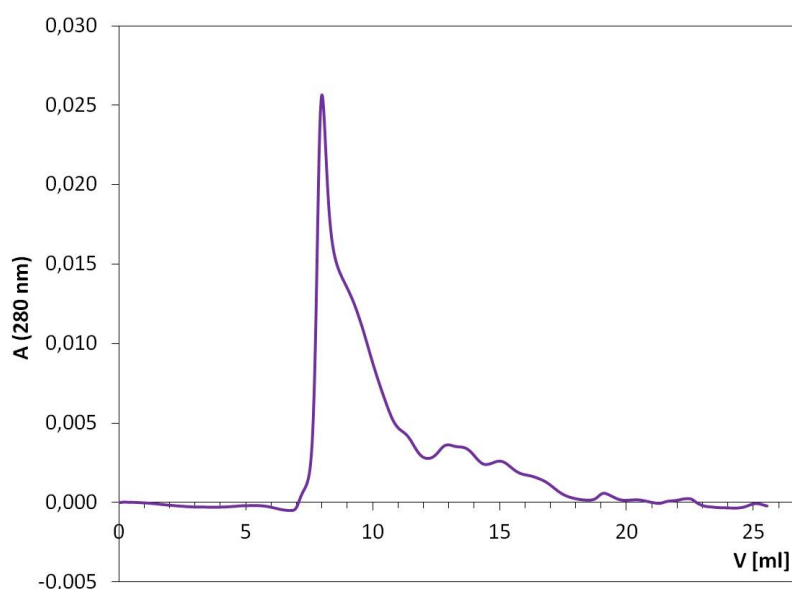


Obr. 14: Purifikace proteinů PIN1a a PIN1b

Vzorky z průběhu purifikace byly separovány SDS elektroforézou a obarveny (dole), nebo přeneseny na membránu a sledovány pomocí imunodetekce (nahore). M - standard, 1 - vzorek homogenizovaných buněk HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a, 2 - nerozpustná frakce, 3 - rozpustná frakce, 4 - membránová frakce, 5 - vzorek homogenizovaných buněk HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1b, 6 - nerozpustná frakce, 7 - rozpustná frakce, 8 - vzorek po purifikaci z cytosolu, 9 - protein LLT1 jako pozitivní kontrola

Z SDS elektroforézy a elektropřenosu s imunodetekcí (obr. 14, str. 43) vyplývá, že oba izolované proteiny svou molekulovou hmotností odpovídají teoretické molekulové hmotnosti proteinů PIN1a a PIN1b. Vzhledem k velkému množství příměsí v roztoku obsahujícím protein PIN1a nebylo možné tento protein identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Byla provedena analýza proteinu hmotnostní spektrometrií, který svou molekulovou hmotností odpovídá teoretické molekulové hmotnosti PIN1b. Tato analýza však nepotvrdila, že se jedná o protein PIN1b.

S médiem odstředěným od buněk transfekovaných plasmidem pTW5sec_PIN1b byla provedena vsádková chelatační chromatografie (5.4.4). Bylo použito pouze médium, jelikož plasmid pTW5sec obsahuje na rozdíl od plasmidu pTW5 sekreční signál a konstrukt PIN1b by se tedy měl nacházet pouze v tomto médiu. Výsledný roztok proteinu byl zkoncentrován a analyzován pomocí gelové permeační chromatografie (obr. 15). Eluční objem konstrukt PIN1b byl odhadován na přibližně 18 ml. Absorbance v této oblasti ovšem byla příliš nízká, tudíž se v roztoku protein PIN1b nevyskytoval, nebo alespoň ne ve formě monomeru. Eluční vrchol viditelný v obr. 15 v oblasti 7 - 8 ml odpovídá mrtvému objemu kolony.

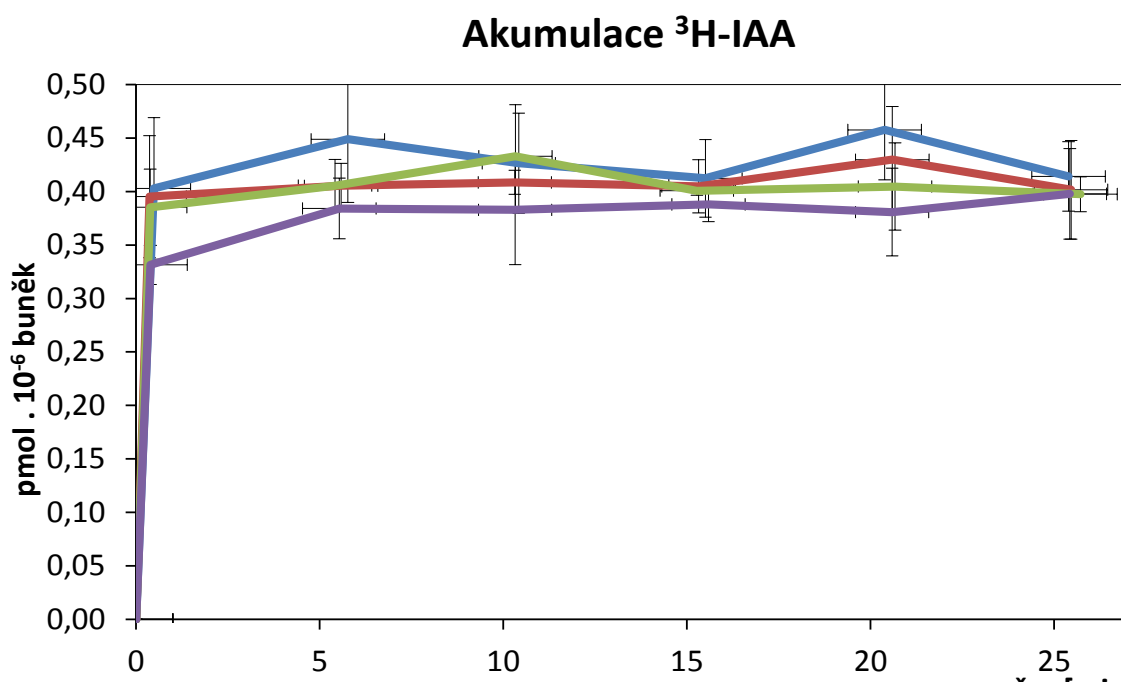


Obr. 15: Gelová permeační chromatografie PIN1b

Chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 10/300

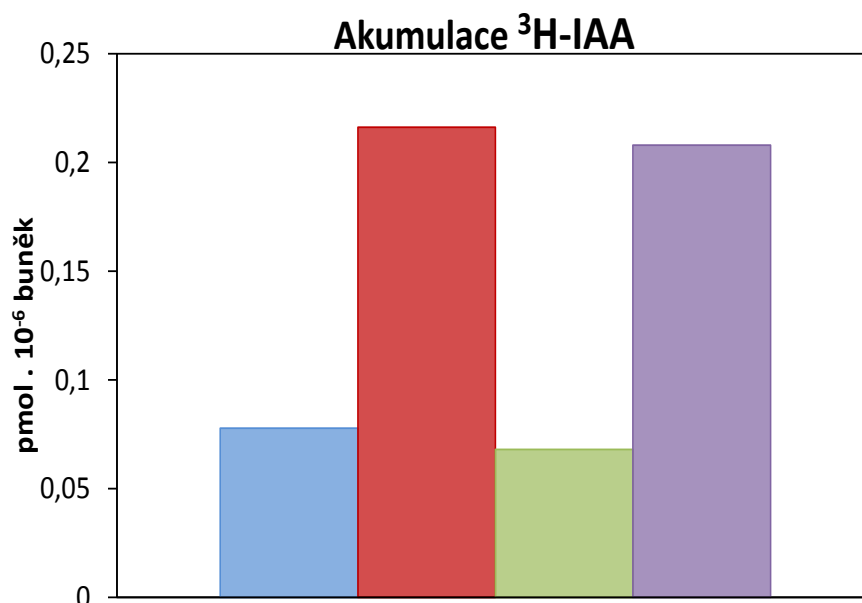
6.5 Akumulace auxinu

Pro ověření, zda je protein PIN1a exprimovaný v membráně HEK293 buněk biologicky aktivní, byl proveden test akumulace radioaktivně značeného auxinu ($^3\text{HIAA}$). Test byl proveden v buňkách HEK293T transfekovaných plasmidem pTW5_PIN1a a dále plasmidy pTW5_GFP a pTW5_SEAP, nesoucích geny pro zelený fluorescenční protein a sekretovanou alkalickou fosfatase, které byly použity jako pozitivní kontrola transfekce a zároveň jako negativní kontrola při testu akumulace. Radioaktivně značený auxin přechází do buněk samovolně difuzí a z buněk by měl být exportován proteinovým transportérem PIN1a, v buňkách exprimujících funkční přenašeč PIN1a by tedy jeho koncentrace měla být nižší. V průběhu testu byly po 5 min odebrány 0,5ml vzorky buněčné suspenze (obr. 16) a na závěr bylo po 50 min odebráno zbylých 7 ml suspenze (obr. 17, str. 46). Ve všech vzorcích byla následně změřena radioaktivita odpovídající množství akumulovaného auxinu.



Obr. 16: Akumulace auxinu při odběrech 0,5 ml buněk

Modrá křivka značí průběh akumulace v buňkách negativní kontroly první série měření, **červená** křivka značí průběh akumulace auxinu v buňkách obsahujících protein PIN1a první série měření, **zelená** křivka značí průběh akumulace v buňkách negativní kontroly druhé série měření, **fialová** křivka značí průběh akumulace v buňkách obsahujících protein PIN1a druhé série měření. Množství akumulovaného auxinu je vyjádřeno v $\text{pmol}/10^6$ buněk.



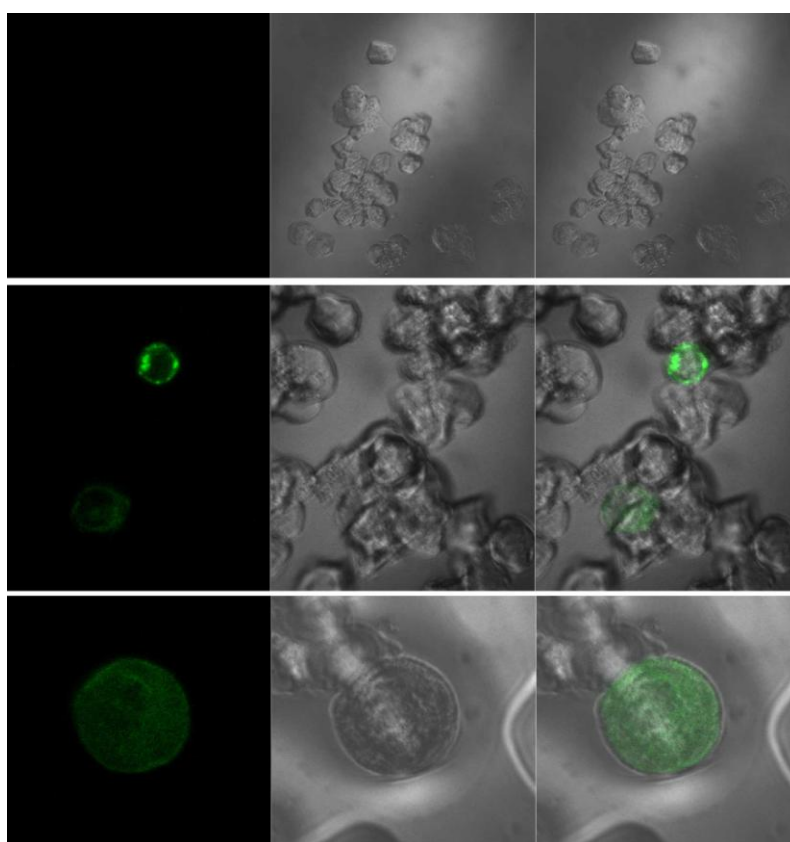
Obr. 17: Akumulace auxinu při odběru 7 ml buněk

Modrý sloupec značí množství auxinu v buňkách negativní kontroly první série měření, **červený** sloupec značí množství auxinu v buňkách obsahujících PIN1a první série měření, **zelený** sloupec značí množství auxinu v buňkách negativní kontroly druhé série měření, **fialový** sloupec značí množství auxinu v buňkách obsahujících PIN1a druhé série měření. Množství auxinu v buňkách je vyjádřeno v pmol/10⁶ buněk.

Z prvního grafu (obr. 16, str. 45) vyplývá, že při odběru malého množství buněk není téměř možné rozlišit buňky obsahující PIN1a od negativní kontroly. Druhý graf (obr. 17) poukazuje na velký rozdíl mezi množstvím auxinu v buňkách negativní kontroly a buňkách obsahujících protein PIN1a. Lze tedy říci, že buňky transfekované plasmidem pTW5_PIN1a tento protein produkují a přenašeč PIN1 je v těchto buňkách plně funkční, ovšem dochází k jeho obrácené aktivitě. Nechová se tedy jako exportér auxinu z buňky, ale naopak napomáhá transportu auxinu do buňky. Přítomnost transportéru PIN1 byla následně ověřena imunofluorescencí.

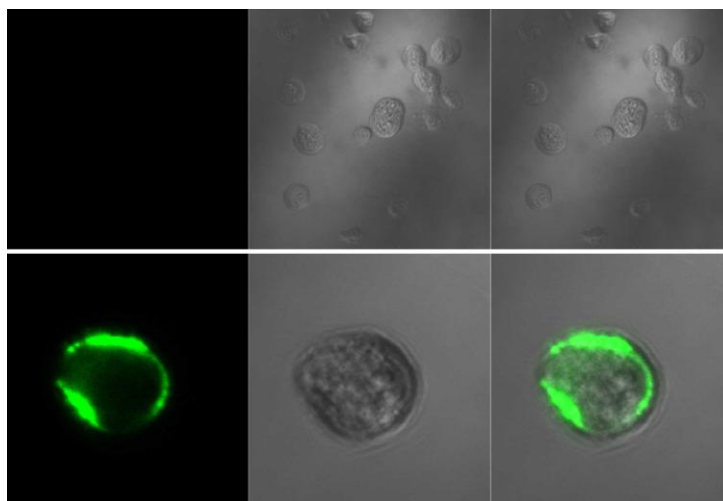
6.6 Imunofluorescence

Produkce transportéru PIN1 byla potvrzena imunofluorescencí pomocí primární protilátky specifické proti PIN1 a fluorescenčně značené sekundární protilátky. Pokus probíhal ve dvou variantách - v první byly buňky HEK293T a HEK293-6E permeabilizovány detergentem (5.6.1), ve druhé permeabilizovány nebyly (5.6.2). Z případného rozdílu signálu by bylo možné usuzovat o orientaci proteinu v membráně. Pro pokus byly použity buňky obou buněčných linií transfekované plasmidem pTW5_PIN1a a buňky netransfekované jako negativní kontrola (obr. 18 - 21, str. 47 - 49).



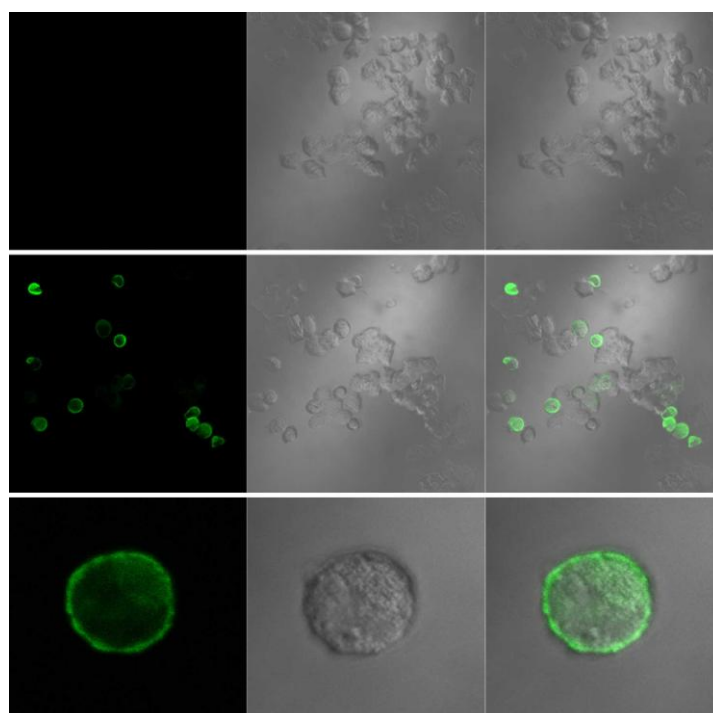
Obr. 18: Imunofluorescence PIN1 u permeabilizovaných buněk HEK293-6E

Expres PIN1 byla sledována protilátkami a fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Nahoře netransfekované buňky kontroly, uprostřed shluk transfekovaných buněk, dole detail vybrané buňky exprimující transportér PIN1; vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů



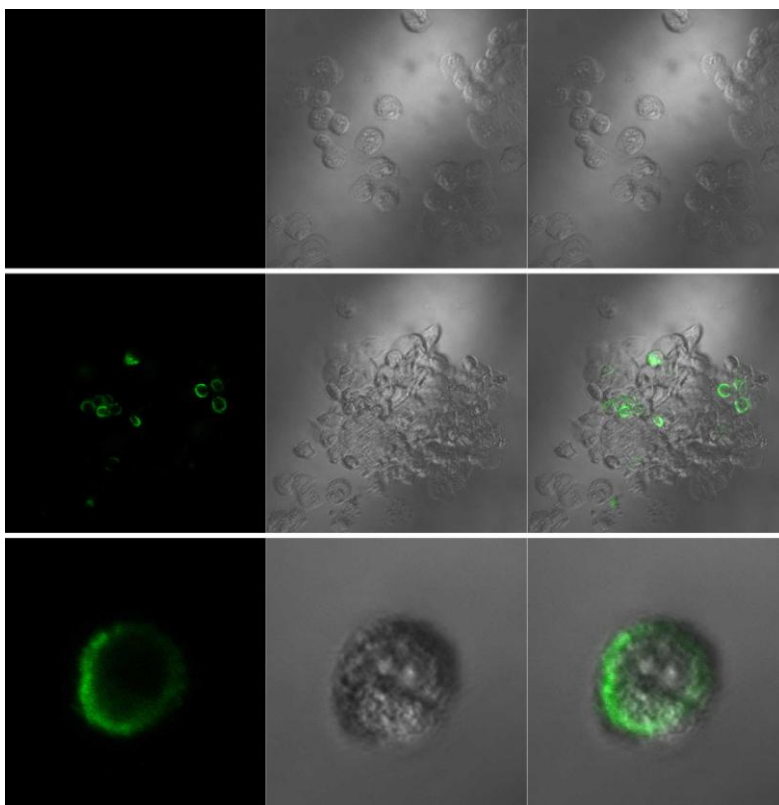
Obr. 19: Imunofluorescence PIN1 u nepermeabilizovaných buněk HEK293-6E

Exprese PIN1 byla sledována protilátkami a fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Nahoře buňky kontroly, dole detail vybrané buňky exprimující transportér PIN1; vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů



Obr. 20: Imunofluorescence PIN1 u permeabilizovaných buněk HEK293T

Exprese PIN1 byla sledována protilátkami a fluorescence byla detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Nahoře netransfekované buňky kontroly, uprostřed shluk transfekovaných buněk, dole detail vybrané buňky exprimující transportér PIN1; vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů



Obr. 21: Imunofluorescence PIN1 u nepermeabilizovaných buněk HEK293T

Exprese PIN1 byla sledována protilátkami a fluorescence detekována pomocí konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Nahoře netransfekované buňky kontroly, uprostřed shluk transfekovaných buněk, dole detail vybrané buňky exprimující transportér PIN1; vlevo fluorescence, uprostřed viditelné světlo, vpravo proložení obou obrazů

Z výsledků imunofluorescence je patrné, že obě buněčné linie transfekované plasmidem pTW5_PIN1a exprimují transportér PIN1, který je umístěn v jejich cytoplasmatické membráně. Nelze však s určitostí rozeznat, jak je transportér v membráně orientován (viz diskuze).

7 DISKUZE

Cílem této práce bylo vyprodukovat auxinový transportér PIN1 v lidských embryonálních ledvinných buňkách HEK293 pomocí rekombinantní exprese. Byla snaha o produkci jak celého proteinu PIN1 (PIN1a), tak o produkci jeho hydrofilní smyčky (PIN1b).

Nejprve byly připraveny expresní vektory. Z výchozího plasmidu pJET_PIN1 připraveném Ústavem experimentální botaniky AV ČR byl pomocí restričních endonukleas AgeI a KpnI vyštěpen inzert PIN1. Inzert byl vložen do plasmidu pTW5, který na rozdíl od plasmidu pJET obsahuje histidinovou kotvu, která umožňuje snadnější purifikaci proteinů. Plasmid pTW5 je vhodnější také z důvodu vyšší exprese rekombinantních proteinů, jelikož plasmid nezaniká dělením buněk a buňky neumírají apoptózou [28]. Takto připravený expresní vektor byl transformován do kompetentních bakterií *E. coli* DH5α. Bylo vybráno několik klonů a připravena plasmidová DNA. Po sekvenaci bylo zjištěno, že na obou koncích inzertu se nacházejí krátké úseky mRNA. Byly tedy připraveny primery, díky nimž byly tyto úseky z templátu pomocí PCR odstraněny a inzert byl rozdělen na dva konstrukty: PIN1a, představující celou sekvenci proteinu PIN1 (tedy shodný s původním inzertem), a konstrukt PIN1b představující sekvenci hydrofilní smyčky proteinu PIN1. Jelikož je konstrukt PIN1b lokalizován v intracelulárním prostředí, byl tento inzert vložen do dvou vektorů - pTW5 a pTW5sec, který obsahuje sekreční signál a protein vzniklý v buňkách HEK293 by měl být sekretován z buněk do média. Klonování těchto vektorů v bakteriích *E. coli* DH5α bylo vždy po izolaci plasmidové DNA z narostlých bakteriálních kolonií ověřováno sekvenováním, přičemž vždy všechny pozitivní klony obsahovaly správnou sekvenci DNA.

Bylo připraveno zásobní množství plasmidové DNA. Plasmidy byly izolovány s poměrně nízkým výtěžkem a čistotou DNA (tab. 1, str. 41). Důvodem nízkého výtěžku mohly být použité kompetentní bakterie. Pro transformaci bakterií plasmidem bylo použito dvou postupů. Bakterie transformované plasmidy pTW5_PIN1a a pTW5_PIN1b byly pěstovány přímo v LB médiu, což je postup zrychlený oproti postupu standardnímu, kdy jsou bakterie po transformaci pěstovány napřed v Petriho miskách s LB-agarem a pro izolaci plasmidu je vybráno pouze několik kolonií. Tento postup byl použit pro bakterie transformované plasmidem pTW5sec_PIN1b. Pro izolaci

plasmidu pTW5_PIN1a a pTW5_PIN1b byla použita již recyklovaná komerčně dodávaná kolona, ovšem pro izolaci plasmidu pTW5sec_PIN1b byla použita kolona nová, tudíž důvodem špatné čistoty DNA pravděpodobně nebyla kontaminace způsobená recyklací kolony. I přes rozdílné postupy přípravy plasmidové DNA byla čistota i koncentrace DNA téměř shodná, tudíž tyto jevy pravděpodobně nebyly způsobeny odlišnými postupy.

Pro provedení expresního testu byly použity dvě buněčné linie - HEK293T a HEK293-6E. Po imunodetekci (obr. 12 a 13, str. 42) bylo patrné, že v buněčné linii HEK293-6E je exprese proteinů méně účinná, a proto bylo dále pracováno jen s buněčnou linií HEK293T. Byla provedena purifikace vyprodukovaných proteinů z buněk HEK293T pomocí komerčně dodávaného nosiče pro chelatační chromatografii Talon, který má vysokou afinitu k histidinové kotvě. Izolace proteinu PIN1b se nepodařila ani z intracelulárního prostředí buněk transfekovaných plasmidem bez sekrečního signálu, ani z média buněk transfekovaných plasmidem obsahujícím sekreční signál. Z literatury není známo, zda buňky mohou vyprodukovat pouze hydrofilní smyčku transportéru PIN1. Izolace proteinu PIN1a byla komplikována tím, že tento protein se z velké části nachází v plasmatické membráně. Po izolaci obsahoval roztok velké množství různých proteinů, a proto byla znemožněna identifikace PIN1a pomocí hmotnostní spektrometrie.

Ke zjištění, zda buňky HEK293 jsou skutečně schopné produkovat auxinový transportér PIN1, bylo použito akumulace radioaktivně značeného auxinu v buňkách. Pro oplach transfekovaných buněk od média bylo použito PBS pufru o pH 5,5. Při tomto pH kyselina indolyl-3-octová neboli auxin disociuje jen z části a nedisociované molekuly mohou přes plasmatickou membránu přecházet difuzí. Při pH 7, které je udržováno uvnitř buňky IAA disociuje úplně, a proto je k exportu auxinu z buňky potřebný transportér. V buňkách obsahujících PIN1 by tedy mělo být menší množství ³HIAA a aktivita naměřená v těchto buňkách by měla být nižší než v buňkách, které tento transportér neprodukují. Při odběrech 0,5ml vzorků nebyl pozorován téměř žádný rozdíl akumulace mezi buňkami představující negativní kontrolu a buňkami obsahující PIN1 (obr. 16, str. 45). To mohlo být způsobeno nízkou hustotou buněk. Rozdíl byl pozorovatelný až při odběru 7 ml vzorku (obr. 17, str. 46), kdy bylo množství auxinu

uvnitř buňky vyšší u buněk obsahujících PIN1. Tato obrácená aktivita PIN1 mohla být způsobena opačnou orientací přenašeče v plasmatické membráně.

Pro další ověření produkce PIN1 buňkami HEK293 byla provedena imunofluorescence s protilátkou specifickou proti PIN1 a fluorescenční detekcí. Pro tento pokus byly transfekovány buňky HEK293T i HEK293-6E a s buňkami bylo pracováno podle dvou postupů. Při jednom došlo k porušení plasmatické membrány buněk přidavkem detergentu a při druhé zůstala plasmatická membrána neporušená. Následně byly buňky pozorovány konfokálním mikroskopem a byla detekována fluorescence. Bylo zjištěno, že obě buněčné linie produkují transportér PIN1. Fluorescence byla patrná u buněk s permeabilizovanou membránou i nepermeabilizovanou membránou (obr. 18 - 21, str. 47 - 49). Nelze tedy s určitostí rozeznat, jak je transportér v membráně orientován. Přestože použitá primární protilátka, která u přenašeče PIN1 přirozeně exprimovaného v rostlinných buňkách pravděpodobně rozeznává epitop na extracelulární části proteinu, by v případě obrácené orientace přenašeče neměla u nepermeabilizovaných buněk poskytnout žádný signál, je možné, že vlivem fixace buněk mohla přecházet i do nepermeabilizovaných buněk. Mohla by tedy nasedat na protein lokalizovaný na obou stranách membrány. Další variantou je, že PIN1 se nachází v membráně HEK293 buněk v obou možných orientacích, čemuž částečně odporuje výsledek z testu akumulace auxinu, kde byl patrný rozdíl oproti kontrole (obr. 17, str. 46). Bylo by ovšem nutné tento výsledek potvrdit opakovaným provedením testu akumulace auxinu s vyšší buněčnou hustotou.

8 ZÁVĚR

- Byly připraveny expresní vektory pTW5_PIN1a, pTW5_PIN1b a pTW5sec_PIN1b.
- Rekombinantní expresí byl připraven protein PIN1a a jeho existence v buňkách HEK293 byla ověřena pomocí testu akumulace auxinu a imunofluorescencí.
- Byl proveden neúspěšný pokus o purifikaci obou proteinů.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Hess D.: Fyziologie rostlin, Academia, Praha, 1983
- [2] Hluska T.: Další úspěch českého rodáka na poli auxinových transportérů (2012), dostupné z URL: <http://www.osel.cz/index.php?clanek=6258> (citováno 30. 3. 2013)
- [3] Chandler J. W.: Local auxin production: a small contribution to a big field, *BioEssays* 31, 60-70 (2009)
- [4] Ljung K., Hull A. K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen D. J., Sandberg G.: Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology* 49, 249-272 (2002)
- [5] Korasick D. A., Enders T. A., Strader L. C.: Auxin biosynthesis and storage forms, *Journal of Experimental Botany* 64, 2541-2555 (2013)
- [6] Grunewald W., Friml J.: The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells, *The EMBO Journal* 29, 2700-2714 (2010)
- [7] Vieten A., Sauer M., Brewer P. B., Friml J.: Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development, *Trends in Plant Science* 12, 160-168 (2007)
- [8] Zažímalová E., Murphy A. S., Yang H., Hoyerová K., Hošek P.: Auxin transporters - Why so many?, *Cold Springs Harbor Perspectives in Biology* 2, 1-14 (2010)
- [9] Peer W. A., Blakeslee J. J., Yang H., Murphy A. S.: Seven things we think we know about auxin transport. *Molecular Plant* 4, 487-504 (2011)

- [10] Bennett M. J., Marchant A., Green H. G., May S. T., Ward S. P., Millner P. A., Walker A. R., Schultz B., Feldmann K. A.: Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273, 948-950 (1996)
- [11] Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik A., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I. D., Bennett M. J.: Structure-Function Analysis of the Presumptive Arabidopsis Auxin Permease AUX1, *The Plant Cell* 16, 3069-3083 (2004)
- [12] Yang Y., Hammes U. Z., Taylor C. G., Schachtman D. P., Nielsen E.: High-Affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein, *Current Biology* 16, 1123-1127 (2006)
- [13] Titapiwatanakun B., Murphy A. S.: Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition, *Journal of Experimental Botany* 60, 1093-1107 (2008)
- [14] Cho M., Lee Z. W., Cho H. T.: ATP-Binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins, *Plant Physiology* 159, 642-654 (2012)
- [15] Blakeslee J. J., Bandyopadhyay A., Lee O. R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S. N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J., Geisler M., Nagashima A., Sakai T., Martinoia E., Friml J., Peer W. A., Murphy A. S.: Interaction among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis, *The Plant Cell* 19, 131-147 (2007)
- [16] Terasaka K., Blakeslee J. J., Titapiwatanakun B., Peer W. A., Bandyopadhyay A., Makam S. N., Lee O. R., Richards E. L., Murphy A. S., Sato F., Yazaki K.: PGP4 an ATP Binding Cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in Arabidopsis thaliana roots, *The Plant Cell* 17, 2922-2939 (2005)

- [17] www.science.leidenuniv.nl/index.php/ibl/mdg/latest_finding
(citováno 5. 4. 2013, upraveno)
- [18] Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., Zažímalová E.: The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters, *Genome Biology* 10, 249 (2009)
- [19] Fozard J. A., King J. R., Bennett M. J.: Modelling auxin efflux carrier phosphorylation and localization, *Journal of Theoretical Biology* 319, 34-49 (2013)
- [20] Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A., Łangowski Ł., Willig K., Naramoto S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robert S., Luschnig C., Govaerts W., Hell S. W., Runions J., Friml J.: Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane, *Molecular Systems Biology* 7, 1-13 (2011)
- [21] Palme K., Gälweiler L.: PIN-pointing the molecular basis of auxin transport, *Plant Biology* 2, 375-381 (1999)
- [22] Petrášek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J. J., Abas M., Seifertová D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubeš M., Čovanová M., Dhonukshe P., Skůpa P., Benkové E., Perry L., Křeček P., Lee O.R., Fink G. R., Geisler M., Murphy A. S., Luschnig C., Zažímalová E., Friml J.: PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux, *Science* 312, 914-918 (2006)
- [23] Sambrook, J., Russell, D. W.: Molecular cloning a laboratory manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA 2001
- [24] JETQUICK Gel Extraction Spin Kit, dostupné z URL:
<http://www.genomed-dna.com/pdf/Quick-PDFs/JETQUICK-Protocol.PDF>
(citováno 29. 6. 2013)
- [25] High-Speed Plasmid Mini Kit, dostupné z URL:
<http://www.geneaid.com/sites/default/files/PD6.pdf> (citováno 29. 6. 2013)

[26] PureLink HiPure Plasmid DNA Purification Kits, dostupné z URL:
http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_hipure_plasmid_dna_purification_man.pdf (citováno 29. 6. 2013)

[27] Wang H., Lee E. W., Cai X., Ni Z., Zhou L., Mao Q.: Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence, *Biochemistry* 47, 13778-13787 (2008)

[28] Poláchová E.: Příprava expresních vektorů regulujících buněčný cyklus a apoptózu pro optimalizaci expresního systému HEK293 buněčné linie, bakalářská práce, PřF UK Praha, 2012

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

[illegible]